Über oxytocin-inaktivierende Gewebe-Extrakte

Hans-Joachim Wiendl

1962

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546810_0062

AUS DER II. FRAUENKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. R. Fikentscher

Über oxytocin-inaktivierende Gewebe-Extrakte

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans-Joachim Wiendl
aus Hof

München 1962

A. Schubert, München 5, Corneliusstr. 21 · Telefon 221777

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent:	Priv.Doz.Dr.K.SEMM
Correferent:	Prof.Dr.R.FIKENTSCHER
Dekan:	Prof.Dr.W.SEITZ

Tag der mündlichen Prüfung: 6.2.1962

INHALT

		Seite
A.	EINLEITUNG	5
B.	LITERATUR	5-11
	Begriff der Serumoxytocinase	5
	Chemie	6
	Bestimmungsmethoden	8
	Bildungsstätte	9
	Klinische und geburtshilfliche Bedeutung	9
	Gewebe-Oxytocinasen	10
C.	MATERIAL UND METHODIK	12-15
	Herstellung der Gewebeextrakte	12
	Biologische Bestimmungsmethode	13
	Chemische Bestimmungsmethode	14
D.	VERSUCHSERGEBNISSE	16-38
	Vorkommen von Gewebe-Oxytocinase in verschiedenen foetalen Organextrakten	16
	Vergleichende Messungen der foetalen Gewebe-Oxytocinase mit zwei verschiedenen Bestimmungsmethoden	25
	Die Hemmung der Gehirn-Oxytocinase mit dem Metallkomplexbildner Ae in Abhängigkeit von der Zeit	29
	Versuche zur Hemmung der Gewebe-Oxytocinase mit bekannten Enzyminhibitoren	29
	Einwirkung auf die Erythrocyten-Oxytocinase von Erwachsenen	31
	Einwirkung auf die foetalen Gewebe-Oxytocinasen	34
	Die Temperaturabhängigkeit der Gewebe-Oxytocinase-Aktivität	35
	Die Oxytocinase-Aktivität bei Blasenmole	36
E.	ZUSAMMENFASSUNG	38
F.	LITERATURVERZEICHNIS	41

A. EINLEITUNG

Die Entdeckung und Erforschung einer Vielzahl von im menschlichen Organismus ablaufenden hormonellen und fermentativen Reaktionen bedeuten ohne Zweifel eine der grössten Leistungen, die die wissenschaftliche Medizin in unserem Jahrhundert vollbringen konnte. Aus den Erkenntnissen über Vorkommen und Wirkungsweise, sowie durch die therapeutische Anwendungsmöglichkeit dieser heute schon vielfach synthetisch darstellbaren Hormone und Enzyme vermochte die Klinik ungeahnten Nutzen zu ziehen. Nicht zuletzt die Geburtshilfe erscheint uns heute aus einem ganz anderen Blickwinkel als dies noch vor wenigen Jahrzehnten möglich war; unterliegen doch alle der Erhaltung der Art dienenden Vorgänge einer hormonellen Steuerung - angefangen von der Follikelreifung als Möglichkeit zur Gravidität überhaupt über die Konzeption und Implantation bis zur Erhaltung der noch unreifen jungen Frucht im mütterlichen Organismus.
Die Bewältigung dieser zuletzt genannten Aufgabe fällt zu einem nicht geringen Anteil der Serumoxytocinase zu, die -vor dreissig Jahren noch völlig unbekannt- im Laufe der letzten zwanzig Jahre von zahlreichen Wissenschaftlern in vielen Einzelheiten erforscht und beschrieben wurde. Heute sind uns Entstehungsort, Eigenschaften, Wirkungsweise und Bedeutung dieses Fermentes weitgehend bekannt; zahlreiche Rätsel geben uns jedoch noch die dem genannten Enzym verwandten Gewebe-Oxytocinasen auf, die sich nicht nur im Blute von Schwangeren auffinden lassen und somit nicht ausschliesslich von geburtshilflicher Bedeutung sein dürften.

Im Rahmen der Arbeiten von Herrn Privatdozent Dr. K. SEMM, Oberarzt an der II. Frauenklinik der Universität München, über das umfangreiche Problem der Oxytocinasen sei mit diesen Untersuchungen ein weiterer Beitrag zur Frage der Gewebe-Oxytocinasen geleistet.

B. LITERATUR

1. BEGRIFF DER SERUMOXYTOCINASE

Erstmals fand FEKETE (5, 6) 1930 bei in vitro-Versuchen am isolierten graviden Meerschweinchenuterus, dass dem Serum von Schwangeren im IX. bis X. Graviditätsmonat zugesetztes Oxytocin in seiner Aktivität deutlich nachliess, bzw. seine Uteruswirksamkeit ganz verlor. Bei Verwendung von Normalseren konnte er diesen Effekt nicht nachweisen. In weitergehenden Experimenten, bei denen sich auch nichtgravide Meerschweinchenuteri als ebenso brauchbar erwiesen, zeigte er auf, dass die kontraktionsauslösende Wirkung des zugefügten Oxytocins sich mit zunehmendem Schwangerschaftsalter der Serumspenderin verminderte. FEKETE zog daraus den Schluss, dass das Oxytocin durch Schwangerenserum auf nicht geklärte Weise umgebaut werde und so seinen kontraktionsfördernden Effekt auf den Uterus verlöre.

Erst 10 Jahre später wurde dieses Problem von WERLE und EFFKEMANN (39, 40, 48) wieder aufgegriffen. In zahlreichen Versuchen am isolierten Meerschweinchenuterus fanden sie im Schwangerenserum ein mit dem Alter der Gravidität gleichmässig zunehmendes Oxytocin-inaktivierendes Prinzip, das erstmals kurz nach Beginn der Schwangerschaft auftrat, zur Zeit der Geburt sein Maximum erreichte und etwa 3 Wochen post partum aus dem Blute verschwand. Dieses nunmehr als Oxytocinase bezeichnete Ferment konnte in Seren von schwangeren Säugern ausser bei einem Pitheceus Rhesus nicht nachgewiesen werden. Ebensowenig konnte es im Schwangerenurin, Fetalblut oder im Fruchtwasser aufgefunden werden. Gleichzeitig wiesen die genannten Forscher auch einen gleichmässigen Anstieg des histaminzerstörenden Fermentes Histaminase während der Schwangerschaft nach; ebenfalls ein Phänomen, das bei allen untersuchten Tiergattungen während der Gravidität nicht festgestellt werden konnte.

2. CHEMIE DER SERUMOXYTOCINASE

Ein Jahr später veröffentlichten WERLE, HEVELKE und BUTHMANN (46) ihre Untersuchungen zur Chemie der Oxytocinase. Es handelt sich dabei um ein nicht dialysierbares, d.h. hochmolekulares, thermolabiles Ferment, das sein Wirkungsoptimum bei einem pH von 6,5 bis 7,5 aufweist. Der Inaktivierungsprozess des Oxytocins folgt dabei einer Zeitreaktion; in der Zeiteinheit wird immer nur der gleiche Bruchteil des Hypophyenhinterlappen-Hormons abgebaut. Bei 24 bis 60 stündiger Dialyse gegen fliessendes Wasser vermindert sich die Oxytocinaseaktivität nur unwesentlich. Unter steriler Aufbewahrung bei 10°C kann das Ferment monatelang voll aktiv erhalten werden. Wird die Oxytocinase mit Aceton und Äther getrocknet und wieder aufgelöst, so ist keine Aktivität mehr nachweisbar, die jedoch nach Zusatz von Gluthation und Cystein wiederkehrt. Ascorbinsäure und Blausäure sind dabei unwirksam. Versetzt man Normalserum von Männern oder nichtschwangeren Frauen mit Cystein oder Gluthation, so wird dieses ebenfalls aktiviert und vermag Oxytocin abzubauen. Somit ist das Trägerprotein der Oxytocinase im Blutserum immer vorhanden und wird in der Schwangerschaft erst durch eine zutretende Substanz (die durch Cystein oder Gluthation ersetzt werden kann) zum aktiven Ferment ergänzt. Diese Vorstufe lässt sich auch im Tierblut nachweisen (untersucht wurden Seren von Hund, Schwein und Rind). In der Frauenmilch ist sie ebenfalls aufzufinden. Auch durch kurzfristiges Kochen inaktivierte Oxytocinase lässt sich durch Cystein und Gluthation reaktivieren; längeres Kochen hingegen zerstört das Ferment irreversibel. Nach dreistündigem Erhitzen auf 57°C kann nur eine Aktivitätsminderung um 30 % festgestellt werden. Bei Hemmungsversuchen mit Blausäure, Natriumpyrophosphat, Quecksilberchlorid, Semicarbazid, Schwefelwasserstoff, Mangan, Cobalt, Magnesium und dem Trypsinhemmungskörper aus Eiklar wird keine Hemmung der Oxytocinase beobachtet. Dieses Ergebnis erlaubte den Schluss, dass diese mit keinem der bisher bekannten proteolytischen Fermente identisch ist, "... sicher hat die Oxytocinase keine SH-Gruppe, Carbonylgruppe oder ein Schwermetallatom im Agon". PAGE (18) beschreibt, dass das

Oxytocin auch zerstört wird durch Hefe-Aminopolypeptidasen (GULLAND und MACRAE (10, 11)), Angiotonin, kristallisiertes Chymotrypsin, Tyrosinase, Papain, Dipeptidasen und Aminopeptidasen des Dünndarmes, vermutet aber, dass die Oxytocinase mit keinem dieser Fermente identisch ist.

Von WERLE und SEMM (44) wird zur Chemie der Oxytocinase weiter berichtet, dass bei der Elektrophorese das Ferment im Bereich der Trennungslinie zwischen Albumin und Globulin erscheint, angelehnt an die a_1-Globulinfraktion. Bei diesen Versuchen konnte auch festgestellt werden, dass die einzelnen elektrophoretisch abgetrennten Serumfraktionen -auch von Nichtschwangeren oder Männern- bei Zugabe zu einem Schwangerenserum-Oxytocinansatz die Oxytocinase praktisch vollkommen hemmten. Von TUPPY (34, 35) und duVIGNEAUD wurde gleichzeitig die Struktur des Oxytocins als ein cyclisch gebautes Octapeptid von folgender Zusammensetzung angeben:

Cystein - Tyrosin - Isoleucin - Glutamin* (NH_2) - Asparagin* (NH_2) - Cystein - Prolin - Leucin - Glycin* (NH_2),

wobei die beiden Cysteinreste durch eine S-S Brücke gekoppelt sind. Durch die Oxytocinase wird das Molekül an der Cystein - Tyrosin - Brücke aufgespalten. Somit wäre die Oxytocinase eine Peptidase, die ganz allgemein nach SMITH (31) nur in Verbindung mit zweiwertigen Metallen ihre Wirksamkeit entfalten können. WERLE und SEMM (44) untersuchten daraufhin, ob die Oxytocinase durch Zugabe von Metallkomplexbildnern zum Reaktionsgemisch hemmbar wäre. Sowohl im 8-Oxychinolin als auch im Idranal III [x] fanden sie Substanzen, die die oxytocinabbauende Fähigkeit des Schwangerenserums praktisch vollkommen aufhoben. "... offenbar wird ein Metallatom gebunden, das für die Oxytocinasewirkung notwendig ist." Die zur Hemmung von 1 ml Serum benötigte Menge betrug dabei um 120 γ.

Durch Zugabe von zweiwertigen Metallionen (ZN^{++}, Co^{++} - und besonders Mn^{++}) konnte das inaktivierte Ferment reaktiviert werden; ein Befund, der später von TUPPY und WINTERSBERGER (37) bei chemischen Nachweismethoden der Oxytocinase nicht erhoben werden konnte. Eine mögliche Aufspaltung des Oxytocinmoleküls an der S-S Brücke konnte durch Versuche von SEMM (29) ausgeschlossen werden. Weitere aufklärende Arbeiten zur Chemie der Oxytocinase wurden von TUPPY und Mitarbeitern (32, 36, 37, 50, 51) geleistet. TUPPY und NESVADBA (36) deklarierten die Oxytocinase als eine Aminopeptidase, da sie vermutlich den amino-endständigen Aminosäurerest des Oxytocinmoleküls abspaltet. Nachdem die zur Ermittlung der Aminopeptidaseaktivität im Serum schwangerer und nicht schwangerer Frauen zunächst verwendeten Aminopeptidasesubstrate Glycin- (d-l-Alanin- und l-Leucin-) -ß--Naphthylamid unterschiedliche und nicht sehr charakteristische Ergebnisse zeitigten, synthetisierten die genannten Forscher im

---

[x] Idranal III = Dinatrium-dihydrogen-äthylendiamin-tetraacetat (im folgenden immer mit Ae abgekürzt).

l-Cystin-di-ß-naphthylamid ein offenbar spezifisches Substrat, das ebenso wie das Peptidhormon Oxytocin N-terminale Halbcystinreste enthält. Mit diesem Substrat, das von Aminopeptidasen unter Abspaltung von ß-Naphthylamin hydrolysiert wird, konnte eine bedeutend erhöhte Aminopeptidaseaktivität im Schwangerenserum gegenüber dem Normalserum nachgewiesen werden. Bei diesen Bestimmungen fanden sich somit auch im Normalserum Aminopeptidasen von geringer Aktivität, die bekanntlich beim biologischen Nachweis am isolierten Rattenuterus nicht ermittelt werden konnten.

In späteren Versuchen fanden WINTERSBERGER und TUPPY (50) bei der Zonenelektrophorese von Schwangerenserum in Stärkegel mittels Leucin-ß-naphthylamid als Anfärbemittel für Aminopeptidasen zwei deutlich gefärbte Banden, von denen nur die breitere -nämlich die der Serumoxytocinase entsprechende- in der Lage war, das l-Cystin-di-ß-naphthylamid zu spalten. Ergänzende Untersuchungen zur Identität der Serumoxytocinase mit einer Aminopeptidase wurden von STOKLASKA und WINTERSBERGER (32) unternommen. Aminopeptidasen wurde 2300- und 4500-fach angereichert und auch damit ein genau gleichartiges Verhalten gegenüber Oxytocin und l-Cystin-di-ß-naphthylamid festgestellt, wie es auch die unfraktionierten Schwangerenseren zeigten. Weiter konnte festgestellt werden, dass die angereicherten Aminopeptidasen auch das in der Schwangerschaft ebenfalls vermehrte Vasopressin spalten. Es wird dazu jedoch angenommen, dass der verstärkte Vasopressinabbau in der Gravidität nicht ausschliesslich auf diese Aminopeptidase zurückzuführen ist, sondern dass in diesem Zeitraum noch andere Fermente auftreten, die wohl Vasopressin, nicht aber das Oxytocin angreifen. Demgegenüber hatten vorher WERLE und KALVELAGE (45) angenommen, dass die oxytocin- und vasopressininaktivierenden Fermente verschiedene Prinzipe seien. Weiter fanden WINTERSBERGER, TUPPY und STOKLASKA (51) im synthetischen l-Cystinyl-di-l-tyrosinamid ein strukturell dem Oxytocin nahestehendes Peptid, das ebenfalls die N-terminale Dipeptidgruppierung des Hypophysenhinterlappenhormons enthält. Diese Substanz konnte als kompetitives Substrat für die Oxytocinase bezeichnet werden, da es einmal durch die Serumoxytocinase aufgespalten wird und zum anderen die Wirksamkeit dieser Oxytocinase gegenüber l-Cystin-di-ß-naphthylamid in gleicher Weise wie gegenüber dem Oxytocin herabgesetzt hat.

Alle diese Befunde, wie auch die Arbeiten von BERANKOWA, RYCHLIK und SORM (1) über den kompetitiven Einfluss einiger peptidischer Fragmente des Oxytocinmoleküls auf die oxytocininaktivierende Aminopeptidase des Serums bekräftigten die Ansicht, dass die Oxytocinase chemisch als eine Aminopeptidase aufzufassen ist.

3. METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER OXYTOCINASEAKTIVITÄT

Die Erkenntnis der Abspaltung von ß-Naphthylamin aus l-Cystin-di-ß-naphthylamid durch Aminopeptidasen war die Grundlage für eine von TUPPY und NESVADBA (36) entwickelte Methode zur chemischen Bestimmung der Oxytocinase im Schwangerenserum (s.a. später).

Die bisher und auch heute noch ausgeführte biologische Methode zum Nachweis der Oxytocinaseaktivität im Serum erfolgt indirekt durch Messung des Abbaues einer bekannten, dem Serum zugesetzten Oxytocinmenge am isolierten Rattenuterus. Erstmals verwendeten DALE und LAIDLAW 1912 den isolierten virginellen Meerschweinchenuterus zur quantitativen Bestimmung des Oxytocins. Die Messgenauigkeit dieser Methode war jedoch durch die gleichzeitig bestehende Histaminempfindlichkeit des Meerschweinchenuterus recht zweifelhaft. Die später von TRENDELENBURG angegebene Standardisierungsmöglichkeit an isolierten Schafsuterusstreifen ergab eine Genauigkeit von $\pm$20 %. Erstmals verwendete MIURA den Rattenuterus zum Nachweis von Oxytocin in der Cerebrospinalflüssigkeit. Diese Methode wurde von PAGE (19) verbessert und später durch WERLE und SEMM (43) und SEMM (28) vervollkommnet bis zu einer für biologische Messungen ungewöhnlichen Genauigkeit auf $\pm$5 % (s.a. später).
MENDEZ-BAUER und CARBALLO modifizierten eine von CROSS und VAN DYKE angegebene Bestimmungsart, indem sie heparinisiertes Plasma mit Oxytocin bei 38°C inkubierten und die vorhandene Oxytocinaseaktivität an der Milchausschüttung der Brustdrüse des Kaninchens ermittelten. Die Wirksamkeit ist dabei gleich dem reziproken Wert der Zeit, die für eine 50 %ige Inaktivierung des Plasmas erforderlich ist.

4. BILDUNGSSTÄTTE DER SERUMOXYTOCINASE

Das ausschliessliche Vorkommen der Oxytocinase im Serum der schwangeren Frau von Mensch und Menschenaffen veranlasste SEMM, dieses Enzym als Schwangerschaftsspezifikum für Primaten erster Ordnung anzusehen. Die Frage nach der Bildungsstätte konzentrierte sich daher von Anfang an auf die Plazenta der genannten Individuen, die als Plazenta hämochorialis olliformis sich morphologisch und histologisch von der aller anderen Tiergattungen unterscheidet. Bereits PAGE (18) vermutete im Trophoblasten den Ursprung der Oxytocinase; das Nichtvorhandensein im foetalen Serum erklärte er mit der Grösse des Proteinmoleküls, das die Plazentarschranke nicht zu durchdringen vermag. Der plazentare Ursprung wurde weiter von CARBALLO und MENDEZ-BAUER (2) diskutiert. Ausgedehnte Untersuchungen zu diesem Fragekomplex wurden von SEMM (23, 29, 30) durchgeführt. Diese Ergebnisse, die er durch Verarbeitung von pathologischem Plazentamaterial (Blasenmole) erzielte und der jüngst gelungene histochemische Nachweis der Oxytocinase in den Syncytiumzellen der menschlichen Plazenta mit intrazellulär durchführbarer Hemmung durch Metallkomplexbildner sichern den plazentaren Ursprung der Serumoxytocinase.

5. KLINISCHE UND GEBURTSHILFLICHE BEDEUTUNG DER SERUMOXYTOCINASE

Die Tatsache, dass im Serum schwangerer Frauen die Oxytocinase kurz nach Eintritt der Schwangerschaft nachweisbar wird und mit zunehmendem Schwanger-

schaftsalter in genau bekanntem Masse bis zum Höchstwert zur Zeit der Geburt ansteigt, veranlasste PAGE (19) daraus einen Schwangerschaftstest zu entwickeln. Dieser wies allerdings anfangs noch grosse Ungenauigkeiten bezüglich des Alters der Frucht auf. WERLE und SEMM (43) konnten später mit Hilfe ihrer verbesserten Bestimmungsmethode am isolierten Rattenuterus in den ersten Wochen der Gravidität eine Diagnosesicherheit von 80 %, vom zweiten Schwangerschaftsmonat an eine solche von 100 % erzielen. Zum Unterschied von allen anderen gebräuchlichen Tests gestattet der Nachweis der Oxytocinase im Serum nicht nur die Feststellung einer überhaupt bestehenden Gravidität, sondern es konnte gleichzeitig das Alter der Frucht mit grosser Genauigkeit errechnet werden. Auch ist es auf diese Weise möglich, gestörte Schwangerschaften im Sinne eines Missed abortion festzustellen, wenn einmal die Oxytocinasekonzentration unter dem für das angegebene Alter der Gravidität zu erwartenden Wert liegt und sie ausserdem bei mehreren in Abständen von einigen Wochen durchgeführten Bestimmungen keinen Anstieg mehr aufweist. Die grosse Bedeutung der Serumoxytocinase wird von SEMM (26, 29) darin gesehen, dass mit zunehmendem Anstieg des Fermentes während der Schwangerschaft der Uterus vor dem kontraktions- und damit wehenauslösenden Einfluss des Oxytocins geschützt wird. Reaktionskinetischen Messungen zufolge kann die Oxytocinase das Oxytocin nicht restlos auf dem Wege von der Hypophyse zum Uterus abfangen. Der wesentliche Teil der Schutzfunktion spielt sich sicherlich an der Uterus-Muskelzelle direkt ab. So ergaben ja auch die jüngsten Messungen von JUNG, dass das Oxytocin mit seiner depolarisierenden Eigenschaft an der Uterusmuskel-Zellmembran selbst angreift. Es besteht somit die Möglichkeit, dass nicht nur das Oxytocin im Bereich der Muskelzelle gespeichert wird, sondern dass auch die Oxytocinase dort vermehrt angereichert werden kann. Der erhöhte Gehalt des schwangeren Uterusmuskels spräche jedenfalls für diese Vermutung.

6. GEWEBE-OXYTOCINASEN

Das ausschliesslich im Schwangerenserum nachgewiesene oxytocininaktivierende Prinzip konnte somit als die beim Menschen und Primaten erster Ordnung absolut schwangerschaftsspezifische Oxytocinase bezeichnet werden. In zahlreichen Arbeiten wird nun aber auch darüber berichtet, dass in den verschiedensten Organgeweben von Mensch und Tier ebenfalls unspezifische Oxytocin-abbauende Enzyme wirksam sind. Selbst in totem Material konnte dieser Effekt nachgewiesen werden. So berichtet 1933 GULLAND und MACRAE (10, 11) dass Aufbereitungen verschiedener Hefen, die Dipeptidase, Aminopolypeptidase und Proteinase enthalten, imstande sind, das Oxytocin in relativ kurzer Zeit bis auf einen bleibenden Rest von 0,7 % abzubauen. Jedoch erschien den genannten Autoren keines der genannten Fermente für den Inaktivierungsprozess allein verantwortlich zu sein. Vielmehr glaubten sie, diesen einem vierten, unbekannten, in den Aufbereitungen stets mit vorhandenen Enzym zuschreiben zu müssen. Später konnten LARSON (14, 15) sowie JONES und SCHLAPP (13) finden, dass Gewebeextrakte aus Leber, Niere, Milz, Muskel und Blut von Hunden, Katzen und Kaninchen imstande sind, die pressori-

sche und oxytocische Komponente des Hypophysenhinterlappenhormons herabzumindern bzw. zu zerstören. Beim vorherigen Kochen der Gewebe geht diese Aktivität verloren. CHRISTLIEB (3) berichtete in Ergänzung zu diesen Arbeiten, dass die Extrakte von Dünndarm am stärksten, die von Muskel am wenigsten wirksam sind; der Effekt wurde mit der Wirkung von überall vorkommenden Gewebeeretasen erklärt. In Schweineovarien konnte von FRIED und WÜST (7) ebenfalls ein oxytocinabbauendes Prinzip gefunden werden. Diese Ovarien-Oxytocinase erwies sich gegenüber der Serumoxytocinase als sehr labil und unbeständig. Bei Zimmertemperatur war nach 5 Stunden eine erhebliche Abnahme der Aktivität zu verzeichnen; durch 24 stündige Dialyse konnte sie völlig zerstört werden. Auch in laktierenden Kuheuterextrakten wurde eine aktive Oxytocinase festgestellt (WERLE und MAIER (47)). Einen Abbau des Oxytocins bei Inkubation zusammen mit Erythrocytenhämolysaten stellte PAGE (18) fest; er liess jedoch die Frage offen, ob das hierbei aktive Prinzip etwa mit der Serumoxytocinase identisch sei. Diese Erythrocyten-Oxytocinase diente WERLE, SEMM und ENZENBACH (41) sowie WERLE und SEMM (44) zur genauen Untersuchung der in den Geweben vorkommenden oxytocininaktivierenden Prizipe und zur Abgrenzung gegenüber der Serumoxytocinase. Die Autoren konnten nachweisen, dass das Enzym im Plasma der Erythrocyten frei gelöst, nicht an das Stroma gebunden ist und die Erythrocytenmembran nicht zu durchdringen vermag. Nach Geschlecht oder Art konnte kein Unterschied festgestellt werden; Schwangere und Nichtschwangere besitzen die Erythrocyten-Oxytocinase in gleichem Masse. Der für die Serumoxytocinase charakteristische Hemmeffekt von Metallkomplexbildnern (Ae) konnte für die Oxytocinase aus Erythrocyten sowie anderen untersuchten Geweben nicht nachgewiesen werden, womit ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal der unspezifischen Proteasen gegenüber der schwangerschaftsspezifischen Aminopeptidase gefunden war. Ebenso fanden BERANKOWA, RYCHLIK und SORM (1) einen Hemmeffekt von Cystin auf Gewebe-Oxytocinasen, nicht aber auf die des Schwangerenserums. Somit ist als sicher anzusehen, dass die Herkunft der Serumoxytocinase nicht in diesen Organen gesucht werden kann.

Insgesamt gesehen vermitteln jedoch die bisherigen Kenntnisse über die Gewebe-Oxytocinasen kein klares Bild. In dieser Arbeit soll nun festgestellt werden, ob das oxytocinabbauende Prinzip auch in den verschiedenen foetalen Gewebeextrakten nachzuweisen ist und wie es sich möglicherweise mit steigendem Fruchtalter verändert. Des weiteren wurde versucht, einen spezifischen Hemmstoff für die Gewebe-Oxytocinase zu finden, um sie in eine der chemisch bekannten Fermentgruppen einreihen zu können.

C. MATERIAL UND METHODIK

Zur Untersuchung auf Oxytocinaseaktivität in foetalen Gewebeextrakten gelangten 14 menschliche Foeten männlichen und weiblichen Geschlechts in einer Grösse von 22 bis 35 cm, welche einer Schwangerschaftszeit von mens IV bis VII entsprechen. Die Bestimmung geschah entweder kurz nach der Ausstossung oder nach höchstens 24-stündigem Tiefkühlen der Foeten bei -10°C. Es wurde die Oxytocinaseaktivität in den Extrakten von Leber, Lunge, Niere, Milz, Herzmuskel, Gehirn, Haut, Nabelschnur, Erythrocyten und Plazenta gemessen.
Im zweiten Teil der Arbeit wurde unter Verwendung von Erythrocyten-Hämolysat von nichtschwangeren Frauen (alle Patientinnen befanden sich bereits im Klimakterium) erforscht, ob durch Einwirkenlassen einer Reihe von dafür in Frage kommenden chemischen Substanzen eine Hemmung der Gewebe-Oxytocinase zu erzielen sei.

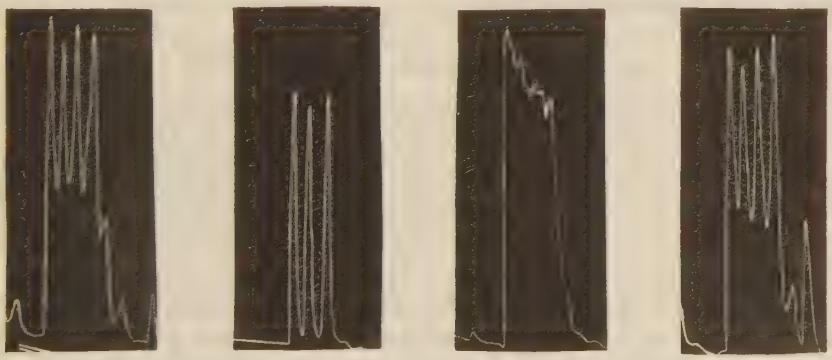
1. HERSTELLUNG DER GEWEBEEXTRAKTE

Die Herstellung der foetalen Gewebeextrakte geschah auf folgende Weise: Das Organ wurde mit dem Messer zerkleinert und, um anhaftende Blutreste möglichst gründlich zu entfernen, mit eisgekühlter physiologischer Kochsalzlösung so lange gespült, bis die überstehende Flüssigkeit klar und von heller Farbe war. Nach Abgiessen der Lösung und Trocknen der restlichen Organteile zwischen Filtrierpapier wurden diese gewogen, im eisgekühlten Mörser mit Seesand zerrieben, um die Zellmembranen zu zerstören, mit einer äquivalenten Menge Aqua dest. versetzt und scharf zentrifugiert. Die überstehende, trübe, zum Teil durch unvermeidliche Blutbeimengungen noch leicht rötlich gefärbte Flüssigkeit enthielt nun die Oxytocinaseaktivität und konnte zur Herstellung der später zu beschreibenden Ansätze herangezogen werden.
In etwas modifizierter Weise geschah die Gewinnung eines oxytocin-abbauenden Extraktes aus Erythrocyten (nach SEMM (29)). Das frische Citrat - Venen- oder Foetalblut wurde scharf zentrifugiert und das Serum verworfen. Das Erythrocytensediment wurde in der 2-4fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt, erneut scharf abzentrifugiert und auf diese Weise dreimal von Serumresten freigewaschen. Diese gereinigte Erythrocytenmenge hämolysierte man mit äquivalenter Menge Aqua dest. und zentrifugierte erneut scharf ab. Die überstehende, dunkelrote, lackfarbene Flüssigkeit enthielt die oxytocin-abbauende Fähigkeit.

Zur Bestimmung der Oxytocinaseaktivität kamen zwei Methoden zur Anwendung; die biologische Messung am isolierten Rattenuterus (Modifikation nach WERLE und SEMM (28, 43)), sowie der chemische Nachweis, der auf der Abspaltung von ß-Naphthylamin aus l-Cystin-di-ß-naphthylamid beruht (TUPPY (36)).

2. BIOLOGISCHE BESTIMMUNGSMETHODE

Nichtgravide, unkastrierte weibliche weisse Ratten im Gewicht von 100 bis 200 Gramm werden durch Nackenschlag getötet. Mit der Schere werden die beiden Uterushörner zusammen mit einem Teil der Scheide entnommen und vom parametranen Fettgewebe freipräpariert; der Scheidenstumpf wird gespalten. Die Aufhängung der 1,5 bis 2 cm langen vaginalen Anteile der beiden Uterushörner erfolgt getrennt in zwei nebeneinander befestigten Suspensionsgefässen. (Die portionahen Abschnitte hatten sich als weniger zu Spontankontraktionen neigend erwiesen als die ovarnahen). Die Suspensionsgefässe mit einem Inhalt von je 12,5 ml enthalten Tyrodelösung von 37°C, die mittels eines einfachen Handgriffes ausgespült und erneuert werden kann. Des weiteren werden sie während der ganzen Versuchsdauer mit Luft durchströmt, was den Uterushörnern eine Überlebenszeit von 6-8 Stunden verleiht. Die optimale Erregungsdosis für über 90 % der Uteri beträgt bei dieser Versuchsanordnung 0,01 IE Oxytocin, sie wird mit einer Tuberkulinspritze in die Suspensionsflüssigkeit gespritzt. Mittels einer Hebelübertragung von 1:8 schreibt dabei der Uterus auf einem Kymographion ein charakteristisches Kurvenbild, das schon bei geringen Abweichungen von der Standardlösung von 0,01 Einheiten deutlich verändert wird (s.a. Abb.1). Nach einer Kontraktionsdauer von 2 min. wird jeweils das Bad mehrmals erneuert, nach 3 min. Erholungszeit erfolgt die neue Oxytocinzugabe. Während der Erschlaffungszeit auftretende Spontankontraktionen stören die Messung nicht. Für die Auswertung des Kurvenbildes ist nicht die Maximalhöhe, sondern der Abstand der unteren Fusspunkte von der Ruhelinie massgebend, er ist der jeweiligen Oxytocindosis direkt proportional.



a b c d

ABBILDUNG 1

a = Standardkurve (0,01 IE Oxytocin);
b = zu geringe Dosis einer unbekannten Oxytocinlösung;
c = zu hohe Dosis der gleichen Lösung; ergibt eine Dauerkontraktion;
d = mit der Standardkurve kongruentes Kurvenbild. Aus der gespritzten Menge kann der Oxytocingehalt der Lösung errechnet werden.

Will man nun eine unbekannte Oxytocinmenge in einer bestimmten Lösung standardisieren, so wird mit der zu spritzenden Menge solange variiert, bis das Kurvenbild mit der Standardkurve von 0,01 IE kongruent ist; aus dem Verhältnis der dazu benötigten Menge zur ursprünglich vorhandenen Gesamtmenge der Lösung lässt sich der Oxytocingehalt leicht berechnen.
Beispiel: Die Standardmenge von 0,01 IE ist in 0,1 ml der folgenden Lösung enthalten: 2,9 ml Aqua dest. + 0,3 IE Oxytocin in 0,1 ml (gilt als Standardlösung für alle beschriebenen Versuche). Muss man nun von einer unbekannten Lösung von insgesamt 3 ml Gesamtmenge 0,3 ml spritzen, um eine kongruente Kurve zu erhalten, so enthalten eben diese 0,3 ml ebenfalls 0,01 IE Oxytocin. Dies bedeutet, dass insgesamt 0,1 IE Oxytocin in der Gesamtlösung vorhanden sind.
Die Messung der Oxytocinaseaktivität in Schwangerenserum oder Gewebeextrakt geschieht nunmehr folgendermassen: Extrakt oder Serum wird zusammen mit einer bekannten Menge Oxytocin unter gleichmässigem Schütteln des Ansatzes gemessene Zeit bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Je nach der Stärke der vorhandenen Fermentkonzentration wird dabei eine mehr oder weniger grosse Menge des zugefügten Oxytocins abgebaut. Die Beendigung der Reaktion erfolgt durch Abkühlen im Eiswasser auf 0°C. Die Stärke der Oxytocinaseaktivität kann aus der Zahl der inaktivierten Einheiten Oxytocin in oben beschriebener Weise leicht ermittelt werden. Die Methode gestattet eine Messgenauigkeit von ±5 % (SEMM (28)). Es gereicht dabei zum Vorteil, dass der Rattenuterus keine Reaktion auf Histamin zeigt. Verunreinigungen des Hypophysenhinterlappenhormons mit Histamin haben somit keine störende Wirkung, falls sie nicht zu hohe Werte erreichen und dadurch die Kontraktion hemmen (SEMM (28)).

3. CHEMISCHE BESTIMMUNGSMETHODE

Die Erkenntnis von TUPPY und Mitarbeitern (17, 36) dass der Oxytocinase die Wirkungsweise einer Aminopeptidase zugrundeliegt, gab Anlass zur Entwicklung einer chemischen Methode zur Bestimmung dieses Fermentes. (s.a. S.7/8). Das Grundprinzip der Methode sei nochmals kurz dargestellt: Das Aminopeptidase-Substrat 1-Cystin-di-ß-naphthylamid wird bei einem optimalen pH von 7,2 bis 7,7 durch die Oxytocinase hydrolysiert, das bei dieser Spaltung freiwerdende ß-Naphthylamin wird nach GREEN, TSOU, BRESSLER und SELIGMANN mittels einer von TUPPY (17, 36) modifizierten Methode folgendermassen bestimmt: ß-Naphthylamin wird durch Natriumnitritlösung diazotiert, das entstehende Naphthyldiazoniumsalz mit N-(1-naphthyl)-äthylendiamin zu einem blauvioletten Farbstoff gekoppelt, der kolorimetrisch nachweisbar ist. Ausführung: 0,30 ml Serum (Gewebeextrakt oder Erythrocytenhämolysat) werden mit 0,45 ml Aqua dest. und 1,50 ml Veronalpuffer (pH 7,9) verdünnt. Von dieser Lösung werden in zwei kleinen Zentrifugenröhrchen je 0,75 ml pipettiert und mit je 0,25 ml Substratlösung versetzt. (Substratlösung: 135 mg 1-Cystin-di-ß-naphthylamid werden in 50 ml einer 0,012 n HCL unter mässigem Erwärmen gelöst; die klare Lösung wird mit

50 ml Aqua dest. verdünnt). In eines der beiden Röhrchen, welches zur Bestimmung des kolorimetrischen Kontrollwertes dient, wird unmittelbar nach der Substratzugabe zur Verhinderung der Enzymreaktion 1,0 ml Trichloressigsäure pipettiert; das andere Röhrchen wird 4 Stunden lang im Wasserbad bei 37°C inkubiert, bevor ebenfalls die Zugabe von 1,0 ml Trichloressigsäure zur Beendigung der Enzymreaktion erfolgt. Von nun an behandelt man den Inhalt der beiden Röhrchen in gleicher Weise. Das durch die Trichloressigsäure ausgefällte Eiweiss wird abzentrifugiert; von der überstehenden klaren Lösung wird 1,0 ml in einen kleinen Erlenmayerkolben pipettiert und in diesem mit 9,0 ml einer Mischung von 2 Volumanteilen 0,36 n HCL und 1 Volumanteil Aceton versetzt. (Die Messung des gebildeten Diazofarbstoffes erfolgt in verdünntem Aceton, da eine Adsorption an den Wänden des Glasgefässes zu fehlerhaften Resultaten führen kann). Wegen der beträchtlichen Lichtempfindlichkeit des entstehenden Naphthyldiazoniumsalzes geschehen die folgenden Zusätze am besten in der Dunkelkammer. Nach jeder Zugabe müssen die Kolben gut durchgeschüttelt werden. Zur Diazotierung des ß-Naphthylamins wird 1,0 ml Natriumnitritlösung (1 %) zugefügt, 5 min. später zur Zerstörung überschüssigen Nitrits 1,0 ml einer 2 %igen Ammoniumsulfamatlösung. Nach weiteren 10 min. erfolgt die Zugabe von 1,0 ml einer 0,1 % wässrigen Lösung von N-(1 Naphthyl)-äthylendiamin-di-hydrochlorid, die das Diazoniumsalz zu einem blauvioletten Farbstoff koppelt. Die maximale Färbung ist nach 3-4 stündiger Aufbewahrung im dunklen Brutschrank bei 37°C erreicht und bleibt viele Stunden konstant. Die Ablesung erfolgt mit einem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 565 mμ in Kuvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Der im Kontrollversuch aufgetretene geringe Extinktionswert wird von dem des eigentlichen Versuches abgezogen; die so erhaltene Extinktionsdifferenz ist der Menge des aus dem Substrat durch den enzymetischen Vorgang freigesetzten ß-Naphthylamins proportional. Als Mass der Aminopeptidaseaktivität gilt die Zahl der Milligramm ß-Naphthylamin, die von 100 ml Serum (oder Gewebeextrakt) in einer Stunde aus dem Substrat abgespalten werden. Man erhält die Zahl durch Multiplikation der Extinktionsdifferenz mit dem Faktor 18,4. Die Fehlergrenze dieser Methode wird zwischen $\pm$1 % bis $\pm$5 % angegeben.

D. VERSUCHSERGEBNISSE

I. VORKOMMEN VON GEWEBE-OXYTOCINASE IN VERSCHIEDENEN FOETALEN ORGANEXTRAKTEN

Vorbemerkungen:

Im folgenden werden verschiedene foetale Organextrakte auf ihren Gehalt an Gewebe-Oxytocinase untersucht. Zur Untersuchung gelangten insgesamt 10 Foeten in einer Länge von 22 bis 35 cm. Die Bestimmung der Oxytocinaseaktivität erfolgte nach der biologischen Methode am isolierten Rattenuterus (s.S.13). Die Herstellung der Ansätze -für jeden Gewebeextrakt in gleicher Weise- geschah folgendermassen:

A. 1,0 ml Gewebeextrakt (Aufbereitung s.S.12) werden mit 1,75 ml Aqua dest. vermischt. Zugabe von 0,75 IE synthetischem Oxytocin[x)] in 0,25 ml. Inkubationszeit zwischen 20 und 120 min. bei 37°C.

B. 1,0 ml Gewebeextrakt werden mit 8,0 mg des Metallkomplexbildners Idranal III (Ae) in 0,8 ml bei Zimmertemperatur 20 min. lang vorinkubiert, dann erfolgt die Zugabe von 0,95 ml Aqua dest. und 0,75 IE Oxytocin in 0,25 ml. Die Gesamtmenge beträgt somit wiederum 3,0 ml. Inkubationszeit zwischen 30 und 120 min.

C. Als Vergleichslösung dient die auf S.14 beschriebene Standardlösung.

Die Berechnung der Oxytocinaseaktivität erfolgt in der Weise, dass angegeben wird wieviel Einheiten der zugefügten 0,75 IE Oxytocin abgebaut werden. Die Angabe erfolgt in Prozent, wobei 0,75 IE gleich 100 % gesetzt werden.

Ergebnisse:

1. Leber:

Untersucht wurde der Leberextrakt von insgesamt 7 Foeten in einer Länge zwischen 22 und 35 cm.

Es zeigt sich dabei, dass der Gehalt an Gewebe-Oxytocinase in der Foetalleber sehr hoch ist. Unabhängig von der Grösse des verwendeten Foeten wird das zugefügte Oxytocin in fast allen Fällen nahezu ganz abgebaut. Die Abbauwerte liegen bei 80 % nach 20 min. langer Inkubation von Extrakt eines 35 cm grossen Foeten, erreichen 82 % bei einem 26 cm langen Foeten und einer Inkubation von 30 min. und liegen bei einer solchen zwischen 60 und 120 min. in jedem Falle zwischen 95 und annähernd 100 %.

Zum genaueren Studium wurde bei einem weiteren Versuch von der optimalen Reaktionstemperatur von 37°C abgegangen und der verwendete Organextrakt eine

---

x) Präparat Syntocinon der Firma SANDOZ A.G.

Stunde lang bei nur 20°C inkubiert. Selbst unter diesen erschwerten Reaktionsbedingungen ergibt sich noch ein Oxytocinabbau von 43 %.
Die in der Literatur mehrfach angegebene Instabilität und der rasche Zerfall der Gewebe-Oxytocinasen binnen weniger Stunden bei Zimmertemperatur wurde ebenfalls nachgeprüft. Zu diesem Zwecke hob man den frisch gewonnenen Extrakt 20, 26 und 72 Std. lang bei 20°C auf, dann erfolgte damit die Herstellung der Ansätze wie oben beschrieben. Die Auswertung ergab nach 20 und 26 Std. noch immer einen gleichermassen hohen Oxytocinabbau von 95 bis fast 100 %; erst nach 72 Std. sinkt er auf 60 % ab. Somit ist zwar ein deutlicher Zeffall der Leberoxytocinase bei Zimmertemperatur festzustellen, der jedoch erst nach einigen Tagen auftritt.

Die von WERLE und SEMM (44) nachgewiesene Hemmbarkeit der Serumoxytocinase durch den Metallkomplexbildner Ae wurde auch an der Gewebe-Oxytocinase nachgeprüft. Eine Hemmung liess sich in keinem Falle erzielen, alle Abbauwerte bewegten sich in gleicher Höhe wie die der nicht mit Ae versetzten Extrakte. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem der genannten Autoren, die für die Gewebe-Oxytocinasen aus Schweineovar, Erythrocyten und Plazenta ebenfalls keine Hemmung finden konnten und diesen Befund als wesentliches Unterscheidungsmerkmal gegenüber der Serumoxytocinase bezeichneten.

2. Niere:

Zur Untersuchung gelangten Nierengewebeextrakte von insgesamt 7 Foeten mit einer Grösse von 22 bis 35 cm. Wie in der Leber zeigt sich auch in der foetalen Niere ein gleichermassen hoher Gehalt an Gewebe-Oxytocinase. Bei nur 20 min. langer Inkubation von Extrakt eines 35 cm grossen Foeten wird bereits ein Oxytocinabbau von 80 % registriert. In den übrigen sechs Fällen erreicht der Abbauwert unabhängig von Inkubationszeit (30 bis 120 min.) und Foetalgrösse jeweils nahezu 100 %. Nach Stehenlassen des frisch bereiteten Extraktes für 20, 26 und 72 Std. bei Zimmertemperatur von 20°C ergeben sich immer noch hohe Inaktivierungswerte des Oxytocins von 87 % nach 20 Std. und 92 % nach 26 Std. Selbst nach 72 Std. ist die Oxytocinaseaktivität noch so gross, dass 80 % des zugefügten Oxytocins abgebaut werden. Ein rascher Zerfall der Gewebe-Oxytocinase wie z.B. für die Ovaroxytocinase (FRIED und WÜST (7)) kann somit auch für das Beispiel der Foetalniere nicht objektiviert werden. Bei Hemmungsversuchen mit Ae wurde in keinem Fall ein deutlicher Aktivitätsverlust nachgewiesen. Selbst bei dem für 72 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrten Nierenextrakt beträgt nach Vorinkubation mit Ae und anschliessender Auswertung am Rattenuterus der Oxytocinabbau noch 73 % (gegenüber 80 % ohne Verwendung von Komplexbildnern).

3. Lunge:

Die Aktivität der Lungenoxytocinase wurde an 5 Foeten in einer Grösse von 22 bis 32 cm bestimmt.

Gegenüber den hohen Werten in Leber und Niere zeigt sich in diesem Organ eine deutlich messbare Verminderung des Fermentgehaltes. Der nur in einem Fall erreichte Höchstwert liegt bei 87 % Oxytocinabbau, drei weitere Foeten verschiedener Grösse weisen einen solchen von 84 % auf, gleichermassen bei ein- und zweistündiger Inkubationszeit. Der niedrigste Wert liess sich bei dem kleinsten der untersuchten Foeten (22 cm) feststellen, er betrug 68 %.
Nach 20 und 26-stündiger Aufbewahrung des Extraktes bei Zimmertemperatur zur Prüfung einer eventuellen Instabilität des Fermentes ergibt sich in einem Fall eine Verminderung der Aktivität um die Hälfte, im zweiten um ein Viertel. Bei Vorinkubation des Gewebes mit dem Metallkomplexbildner Ae konnte im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Leber und Niere eine leichte Hemmung der Fermentaktivität nachgewiesen werden. Diese nimmt beim frischen Extrakt um etwa ein Viertel, bei der für 20 oder 26 Std. aufbewahrten Nierensubstanz etwas mehr, nämlich um ein Drittel ab.

4. Erythrocyten:

Die starke Aktivität der Gewebe-Oxytocinase in Erythrocyten von Männern, nichtschwangeren Frauen sowie Tieren wurde schon von zahlreichen Forschern nachgewiesen (s.a.S.11). Sie kann auch in foetalen roten Blutkörperchen in gleicher Weise festgestellt werden. Untersucht wurde Erythrocytenhämolysat von vier Foeten von 25 bis 35 cm Grösse. Die Herstellung des Hämolysats erfolgte wie auf S.12 beschrieben. Schon nach einer Inkubation des Ansatzes eines 35 cm langen Foeten von nur 20 min. bei 37°C ergibt sich ein Abbau des zugefügten Oxytocins in Höhe von 87 %. Er liegt damit noch um wenige Prozent höher als bei den als sehr fermentaktiv nachgewiesenen Leber- und Nierengeweben. Bei längerer Inkubation von 30 und 60 min. steigt die Inaktivierung des Oxytocins auf 92 bis nahezu 100 % der ursprünglich zugesetzten Menge von 0,75 IE.
Nach 20 stündigem Aufbewahren des Hämolysats bei Zimmertemperatur ist kein messbarer Aktivitätsverlust der Erythrocyten-Oxytocinase nachzuweisen; nach insgesamt 72 Std. aber sinkt die Fähigkeit, Oxytocin zu inaktivieren stark ab: nur mehr 27 % des Hypophysenhinterlappenhormons können nach dieser Zeit abgebaut werden. Von allen bisher beschriebenen Geweben zeigt somit die Erythrocyten-Oxytocinase die grösste Instabilität, die jedoch erst nach Tagen manifest wird. Hemmungsversuche mit Ae brachten in keinem Fall ein positives Ergebnis; die Erythrocyten-Oxytocinase kann in ihrer Aktivität durch Vorinkubation mit dem Metallkomplexbildner nicht gemindert werden.

5. Milz:

Wegen der geringen Grösse des Organs konnte die foetale Milz nur bei den grösseren Foeten ab 30 cm Länge auf ihren Gehalt an Gewebe-Oxytocinase untersucht werden. Es wurden insgesamt 4 Bestimmungen durchgeführt. Die Fermentaktivität der Milz liegt in jedem Falle unter der bei Leber- und Nierenextrakten ge-

fundenen. Nach 20 min. langer Inkubation eines Extrakt-Ansatzes von einem Foeten von 35 cm Grösse ergibt sich ein Oxytocinabbau von 60 %, die Werte bei länger dauernder Inkubation (30 bis 120 min.) liegen zwischen 87 und 92 %. Wird der Extrakt 20 Std. lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt, so sinkt der Prozentsatz des Oxytocinabbaues von 92 auf 60. Eine messbare Zerstörung des Ferments in dieser Zeit lässt sich somit deutlich nachweisen. Hemmversuche mit Ae bleiben in jedem Falle ohne Erfolg.

6. Herzmuskel:

Das Organ wurde ebenfalls bei vier grösseren Foeten auf seine Oxytocinaseaktivität untersucht. Es zeigt sich ein Fermentgehalt, der etwa dem in der Milz vergleichbar ist. Nach Inkubation von nur 20 min. bei 37°C ergibt sich ein Abbau des zugefügten Oxytocins in Höhe von 45 %, der bei längerdauernder Inkubation rasch ansteigt und gleichermassen bei 60 wie 120 min. Werte von 80 bis 92 % erreicht.

Nach Stehenlassen des Extraktes für 26 Std. bei 20°C und anschliessender Auswertung ergibt sich ein starker Abfall der Fermentaktivität; der Oxytocinabbau beträgt dann nur mehr 20 %. Versuche, die Oxytocinase des Hermuskels mit Ae zu hemmen, ergaben in einem Falle keine, in einem zweiten eine nur geringe Hemmung der oxytocinabbauenden Fähigkeit.

7. Haut:

In drei Fällen wurde der Fermentgehalt von foetaler Haut mit dem anhängenden Unterhautfettgewebe bestimmt. Auch für diesen Gewebeextrakt zeigt sich ein relativ hoher Gehalt an Oxytocinase. Die Abbauwerte des zugefügten Oxytocins liegen bei 80 % nach halbstündiger Inkubation und steigen bei einer solchen von einer oder zwei Stunden auf jeweils 90 % an. Der Versuch, die Haut-Gewebe-Oxytocinase durch Stehenlassen des Extraktes für 20 Std. bei Zimmertemperatur möglicherweise zu zerstören, ergibt eine deutliche Verminderung der Fermentkonzentration. Der Abbauwert sinkt in diesem Falle von 90 auf 50 % bei gleichen Versuchsbedingungen ab. Mit Ae konnte in beiden untersuchten Fällen eine nur mässige Hemmung der Gewebe-Oxytocinase erreicht werden.

8. Plazenta:

Der Fermentgehalt im Plazentaextrakt von 22 bis 34 cm langen Foeten ist in drei untersuchten Fällen erwartungsgemäss sehr hoch. Ohne Beeinflussung durch die Inkubationsdauer von 30 bis 120 min. liegt der Abbauwert des dem Ansatz beigegebenen Oxytocins gleichermassen bei nahezu 100 %. Die Plazenta, die durch zahlreiche Versuche von SEMM (23, 29) als Bildungsstätte der Serumoxytocinase angesehen werden kann, enthält somit gleichzeitig die höchste Konzentration von Gewebe-Oxytocinase aller untersuchten Organe. Auch nach 20-stündigem Aufbe-

wahren des Plazentaextraktes bei Zimmertemperatur und anschliessender Auswertung beträgt der Oxytocinabbau gleichbleibend nahezu 100 %, um erst nach 72 Std. auf 73 % abzusinken. Auch die Plazenta-Oxytocinase weist somit wie die der Niere eine relativ grosse Stabilität auf. Mit dem Metallkomplexbildner Ae konnte somit bei keinem der Versuche eine Hemmung der in der Plazenta vorkommenden Gewebe-Oxytocinase erzielt werden.

9. Nabelschnur:

Der in zwei Fällen untersuchte Extrakt von Nabelschnurgewebe weist jeweils keinerlei Oxytocinaseaktivität auf.

10. Gehirn:

Die in der Gehirnmasse auftretende Gewebe-Oxytocinase-Aktivität verhält sich zu der in den bisher beschriebenen Organen sehr unterschiedlich. Deshalb wurde die Fermentbestimmung in diesem Organ bei allen 10 Foeten durchgeführt. Wird der Ansatz von Gehirnextrakt eines 35 cm langen Foeten 20 min. lang bei 37°C inkubiert, so ergibt sich ein Abbau der hinzugefügten 0,75 IE Oxytocin von nur 0,15 IE = 20 %. Mit zunehmender Inkubationsdauer steigt der Abbauwert über 33 % auf den in der überwiegenden Anzahl der untersuchten Fälle gefundenen Prozentsatz von 50 bis 60 an. Der in nur einem Versuch erzielte Höchstwert liegt bei 73 %. Bei einem Foeten wurde die Fermentaktivität des Gehirnextraktes in ihrer Abhängigkeit von der steigenden Inkubationszeit ermittelt. Nach 30 min. kann ein Oxytocinabbau von 33 % gemessen werden, nach 60 min. erreicht er den Höchstwert von 60 %, der sich auch nach zweistündiger Inkubation nicht mehr verändert. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem der anderen untersuchten Organextrakte, wo auch keine Zunahme der Aktivität festgestellt werden konnte, wenn die Inkubationszeit statt mit 60 mit 120 min. gewählt wurde.
Auch das Alter der untersuchten Foeten scheint auf die Fermentkonzentration keinen wesentlichen Einfluss auszuüben: Der Gehirnextrakt eines ausserhalb der Versuchsreihe untersuchten totgeborenen Kindes von 40 cm Länge erbrachte keinen höheren Abbauwert als beispielsweise bei einem Foeten von nur 22 cm Grösse.

Wieder wurde untersucht, ob die Gehirn-Oxytocinase bei längerem Stehenlassen bei Zimmertemperatur einem deutlichen Zerfall unterliegt. Die Aktivitätsminderung erweist sich dabei ungleich höher als bei allen bisher untersuchten Organextrakten; sie beträgt nach 20 bzw. 26 Std. nur mehr die Hälfte bis gut ein Drittel der ursprünglich ermittelten Werte; nach 72 stündigem Aufbewahren bei 20°C beträgt der Oxytocinabbau 0 % - es ist somit keine Oxytocinaseaktivität mehr vorhanden. Der bemerkenswerteste Unterschied der foetalen Gehirn-Oxytocinase zu allen anderen Gewebe-Oxytocinasen zeigte sich bei Versuchen mit Vorinkubation des Extraktes mit Ae, die in allen 10 Fällen durchgeführt wurde. Abgesehen von einem Versuch, bei dem, wahrscheinlich auf Grund eines Fehlers in der Ausführung, keine messbare Hemmung der Oxytocinaseaktivität festzustellen war, konnte in allen übrigen Fäl-

len eine vollständige Hemmung des Fermentes erzielt werden. Durch Zugabe von 8 mg des Metallkomplexbildners Ae zum Gehirnextrakt und 20 min. langer Vorinkubation vor der Auswertung des Ansatzes kann die Wirksamkeit der Gehirn-Oxytocinase somit völlig ausgeschaltet werden. Dieses Ergebnis legt die Schlussfolgerung nahe, dass im Gehirn mindestens zwei verschiedene oxytocinabbauende Fermentsysteme wirksam sind, von denen eines mit ähnlichen Eigenschaften wie die Serumoxytocinase ausgestattet ist.

Abschliessend seien die wichtigsten Ergebnisse dieser Versuchsreihe nochmals kurz zusammengefasst:
Durch indirekte Messung des Abbaues einer bekannten, dem Ansatz beigefügten Oxytocinmenge am isolierten Rattenuterus wird die Aktivität an oxytocinabbauender Gewebe-Oxytocinase in verschiedenen foetalen Organen bestimmt. Mit Ausnahme von Nabelschnurextrakt kann das Ferment in allen untersuchten foetalen Geweben nachgewiesen werden.
Die Konzentration erweist sich am höchsten in Plazenta, Niere, Leber und Erythrocyten, liegt niedriger in Milz, Haut, Hermuskel und Lunge und erreicht den tiefsten Wert im Gehirn. Das Alter der Frucht sowie das Geschlecht haben keinen Einfluss auf den Fermentgehalt der Gewebe, zumindest von IV.Monat aufwärts. Nach einer Inkubationszeit des Ansatzes von 60 min. (bei einigen hochaktiven Organen auch schon bei 30 min.) ist der durchschnittliche Höchstwert des Oxytocinabbaues erreicht, er steigt bei längerdauernder Inkubation (bis 120 min.) nicht mehr weiter an.
Mit Ausnahme der voll hemmbaren Gehirn-Oxytocinase kann mit dem Metallkomplexbildner Ae keine signifikante Hemmung der Fermentaktivität erreicht werden. Der in der Literatur angegebene rasche Zerfall der Gewebe-Oxytocinasen nach Stehenlassen bei Zimmertemperatur kann für die meisten Organe nicht objektiviert werden. Immerhin ist jedoch nach 3 Tagen eine deutliche Abnahme der Aktivität zu verzeichnen. 24 stündiges Tiefkühlen des Versuchsmaterials bei $-10^{o}C$ hat auf die Ergebnisse keinerlei Einfluss.

Die durch die jeweils vorhandene Oxytocinaseaktivität bedingten durchschnittlichen Oxytocin-Abbauwerte sind unter Berücksichtigung der mittleren und quadratischen Aberration σ in der Abb.2 zusammengefasst. Ein Foet, dessen Gewebeextrakt nach nur 20 min. langer Inkubation deutlich tiefere Fermentwerte aufwiesen, wurde dabei gesondert berücksichtigt.
Die genauen Einzelergebnisse aller Versuche sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt.

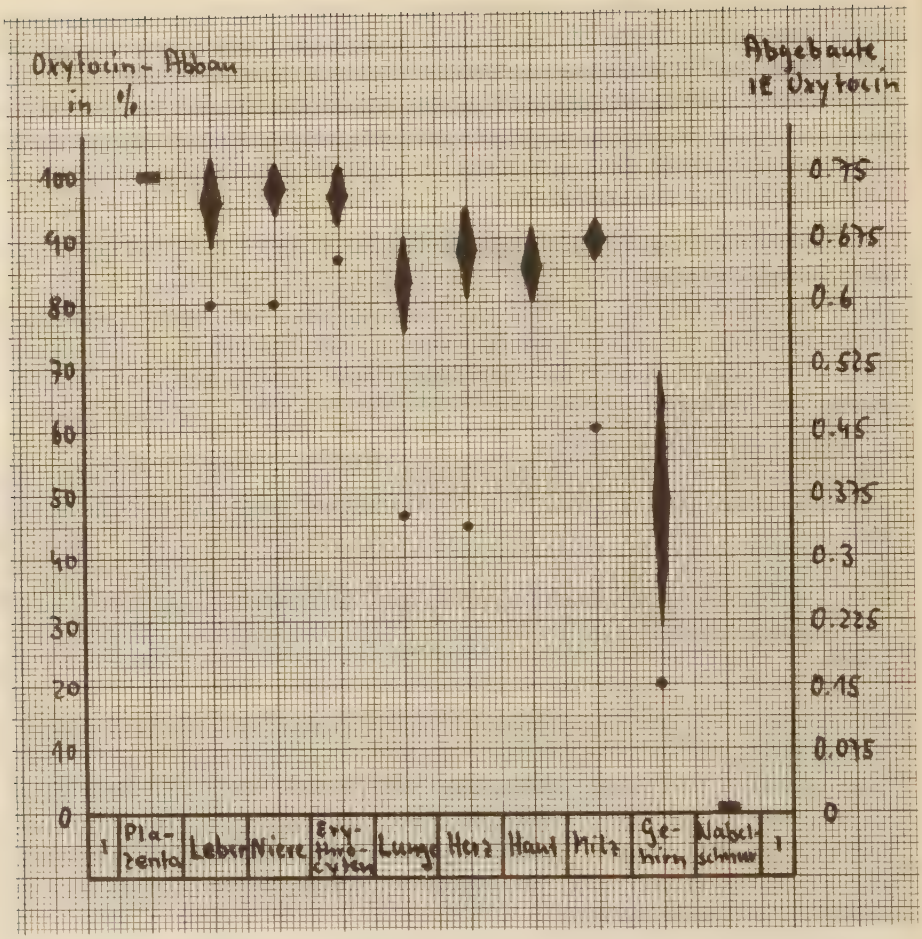


ABBILDUNG 2

Die Oxytocinaseaktivität der verschiedenen foetalen Gewebeextrakte, gemessen am Abbau der dem Ansatz zugefügten Oxytocinmenge von 0,75 IE. Ansätze s.S.16.

Die mittlere quadratische Aberration wurde errechnet nach der Formel

$$\sigma = \sqrt{\frac{y_1 (x_1 - m) + y_2 (x_2 - m)}{N - 1}}$$

dabei bedeuten x_1 x_2 die Variation, y_1 y_2 die Häufigkeit einer Grösse.

Die Oxytocin-Abbauwerte von einem Versuch, die gegenüber dem Mittel deutlich erniedrigt sind, da die Inkubationszeit der Ansätze nur 20 min. betrug, sind gesondert berücksichtig und mit einem · bezeichnet.

	Foet I 32 cm, ♀				Foet II 22 cm, ♂		Foet III 28 cm, ♂				Foet IV 25 cm, ♀		Foet V 23 cm, ♀		
Ansatz	A	B	A_{26}	B_{26}	A	B	A	B	A_{20}	B_{20}	A	B	A	B	A_{20}
Inkubation in min.	120	120	120	120	120	120	120	120	120	120	60	60	60	60	60
Erythrocyten											~100	95			
Gehirn	60	60	33	0	73	50	56	0	25	0	42		20	0	0
Haut							90	50	67	33			90	80	
Herzmuskel	80	80	20	0			>92								
Leber	~100	~100	~100	~100	~100	~100	~100	~100	95	95	~100				
Lunge	87	73	73	50	68	68	84	60	47	33	84				
Milz	>92	>92	60												
Niere	~100	>92	~100	~100	90		~100	>92	87		~100				
Plazenta							~100	~100	~100	~100					
Nabelschnur													0		

TABELLE 1 (Erkl.S.25)

	Foet VI 27 cm, ♀			Foet VII 22 cm, ♂		Foet VIII 26 cm, ♂		Foet IX 34 cm, ♂				Foet X 35 cm, ♂		M_A	σ
Ansatz	A	B	A_{20}	A	B	A	B	A	B	A_{72}	B_{72}	A	B		
Inkubation in min.	60	60	60	60	60	30	30	30	30	30	30	20	20		
Erythrocyten	~100	~100	>92					92	90	27	0	87		97	4,6
Gehirn	33	0	0	60	0	20	0	56	0	0		20	0	49	19,2
Haut						80	73							86	5,8
Herzmuskel	93	80										45		88	7,4
Leber						82	82	> 92	>92	60		80		96	7,4
Lunge				84	56							47		83	7,7
Milz	90							87	85			60		90	2,5
Niere						~100	>92	~100	> 92	80	73	80		98	4,1
Plazenta				100	93			~100	>92	73	73			~100	0
Nabelschnur						0								0	0

TABELLE 2 (Erkl.S.25)

Tab.1 und 2: Die Oxytocinase-Aktivität in foetalen Gewebeextrakten.

Die Zahlen geben den Oxytocin-Abbau in Prozent an.

Ansatz A: jeweils 1,0 ml Gewebeextrakt + 1,75 ml Aqua dest. + 0,75 IE Oxytocin in 0,25 ml;

Ansatz B: jeweils 1,0 ml Gewebeextrakt, mit 8,0 mg Ae in 0,8 ml 20 min. lang bei 20°C vorinkubiert, dann Zugabe von 0,95 ml Aqua dest. + 0,75 IE Oxytocin in 0,25 ml;

Ansatz $A_{20/26/72}$: der frische Gewebeextrakt wurde 20 (26/72) Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt, dann Ansatz wie bei A;

Ansatz $B_{20/26/72}$: der frische Gewebeextrakt wurde 20 (26/72) Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt, dann Ansatz wie bei B.

II. VERGLEICHENDE MESSUNGEN DER FOETALEN GEWEBE-OXYTOCINASE MIT DER BIOLOGISCHEN UND CHEMISCHEN BESTIMMUNGMETHODE

Im folgenden wurden die Gewebeextrakte von vier weiteren Foeten in einer Grösse von 24 bis 29 cm mittels der chemischen Bestimmungsmethode (TUPPY) auf ihre Oxytocinaseaktivität geprüft. Zweck der Untersuchungen war es, herauszufinden, ob die Ergebnisse mit den bisher mit der biologischen Methode am isolierten Rattenuterus ermittelten übereinstimmen. Die Gewebe von zwei Foeten wurden gleichzeitig mit Hilfe beider Methoden untersucht. Die Herstellung der Extrakte erfolgte wie auf S.12 angegeben. Zur genauen Beschreibung und Erklärung der chemischen Methode des Oxytocinasenachweises s.S.14/15. Die angegebenen Zahlenwerte stehen als Mass für die Aminopeptidase- (Oxytocinase-) Aktivität des jeweils untersuchten Gewebes. Sie geben dabei die Zahl der mg ß-Naphthylamin an, die umgerechnet von 100 ml Gewebeextrakt in einer Stunde aus dem Substrat abgespalten werden.
Für die Organextrakte der Foeten XI und XII ergibt dabei die Menge der ermittelten Oxytocinaseaktivität folgende Werte:

	Foet XI	Foet XII
Leber	1,40	-
Lunge	3,57	0,28
Milz	2,74	-
Niere	4,75	0,26
Gehirn	0,64	0,24
Haut	0,55	-
Herzmuskel	-	0,0

Die erheblich verminderte Oxytocinaseaktivität in den Geweben von Foet XII erklärt sich dadurch, dass diese Frucht in bereits sehr stark mazeriertem Zustand mit

hochgradige Autolyse der inneren Organe ausgestossen wurde. Damit wird aufgezeigt, dass die Fermentkonzentration in diesem Falle zwar noch in geringer Menge erhalten, gegenüber dem Normalwert aber deutlich erniedrigt ist. (S. dazu auch Abb.3).

Die Gewebeaktivität der Foeten XIII und XIV wurden jeweils gleichzeitig nach der chemischen und biologischen Methode bestimmt. Die Herstellung der Ansätze für die Messung am isolierten Rattenuterus erfolgte in gleicher Weise wie auf S.16 angegeben. Die Inkubationszeit betrug jeweils 30 min. bei 37°C.

Da das Zahlenverhältnis: Zahl der freigesetzten mg ß-Naphthylamin zum prozentualen Abbauwert des bei der biologischen Methode zum Ansatz zugefügten Oxytocins mathematisch bisher noch nicht erfasst wurde, seien nur die absoluten Werte nebeneinander gestellt.

Die Aktivitätsbestimmung der Gewebe-Oxytocinasen bei den Foeten XIII und XIV zeigten folgende Ergebnisse:

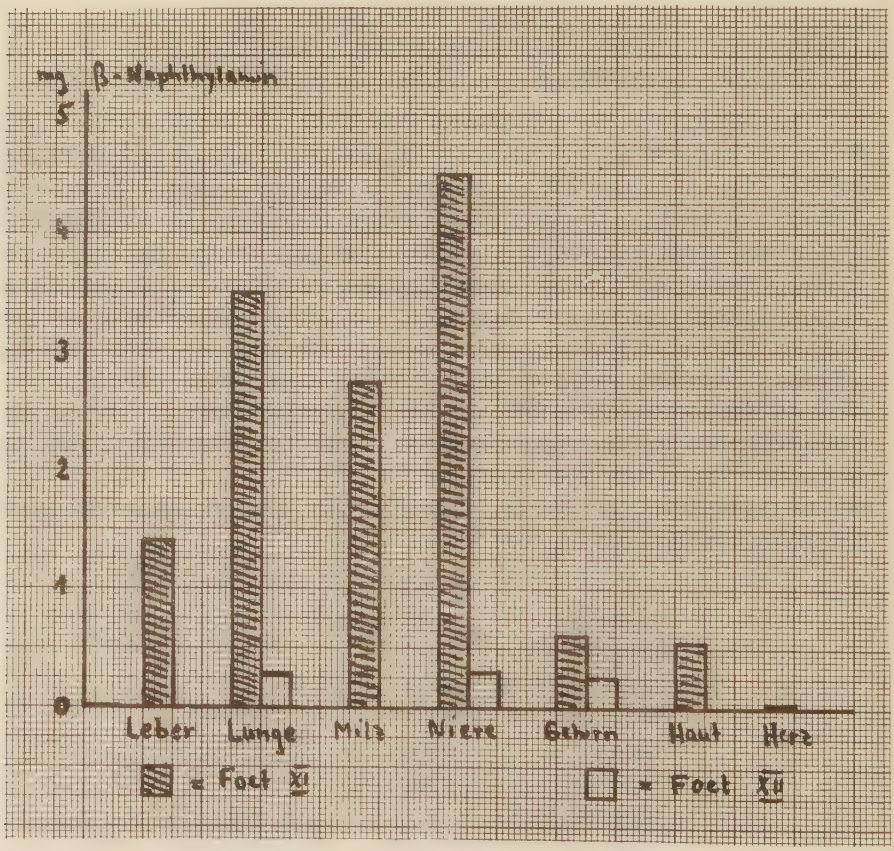


ABBILDUNG 3 (Erkl. im Text)

	Biologische Methode (Abbau der zugefügten 0,75 IE Oxytocin in %)	Chemische Methode (Zahl der freigesetzten mg ß-N.-amin pro 100 ml Extrakt)
Foet XIII:		
Leber	90	3,50
Erythrocyten	87	2,87
Lunge	33	0,83
Gehirn	33	0,48
Plazenta	82	2,58
Niere	92	3,35
Foet XIV:		
Leber	77	0,59
Lunge	50	0,92
Niere	87	2,0
Erythrocyten	80	2,0
Herzmuskel	42	0,50

Es kann festgestellt werden, dass der absolute Wert der freigesetzten mg ß-Naphthylamin bei den einzelnen Versuchen trotz gleicher Durchführung grösseren Schwankungen unterworfen ist als der Prozentsatz der jeweils abgebauten Oxytocinmenge. Dennoch liefert im Einzelfall auch bei der chemischen Methode das Verhältnis der Oxytocinaseaktivitäten der verschiedenen Gewebe zueinander das gleiche Ergebnis wie es mit dem biologischen Nachweis erzielt werden konnte: Der Fermentgehalt ist jeweils am höchsten in Leber, Niere und Erythrocyten, am weitaus geringsten im foetalen Gehirn.

Zur anschaulichen Darstellung dieser Versuchsergebnisse s. auch Abb.4

Auch der in vorhergehenden Versuchen erhobene Befund, dass die Gehim-Oxytocinase durch den Metallkomplexbildner Ae gehemmt werden kann und somit chemisch Ähnlichkeit mit der Serumoxytocinase aufweist, konnte durch den chemischen Oxytocinasenachweis objektiviert werden. Die in zwei Fällen ermittelte Fermentaktivität im Gehirnextrakt betrug 0,48 bzw. 0,24 mg Naphthylamin pro 100 ml Extrakt und Stunde. Demgegenüber sanken diese Werte in den mit Ae gehemmten Ansätzen auf 0,22 (statt 0,48) und 0,09 (statt 0,24) ab; d.h. die Oxytocinaseaktivität war auf über die Hälfte abgesunken. Ähnliche mit dem Nierenextrakt vorgenommene Hemmversuche mit Ae erbrachten nur einen ganz geringfügigen Wirkungsabfall

Die Hemmbarkeit der Gehirn-Oxytocinase mit Ae war noch Gegenstand weiterer Versuche:

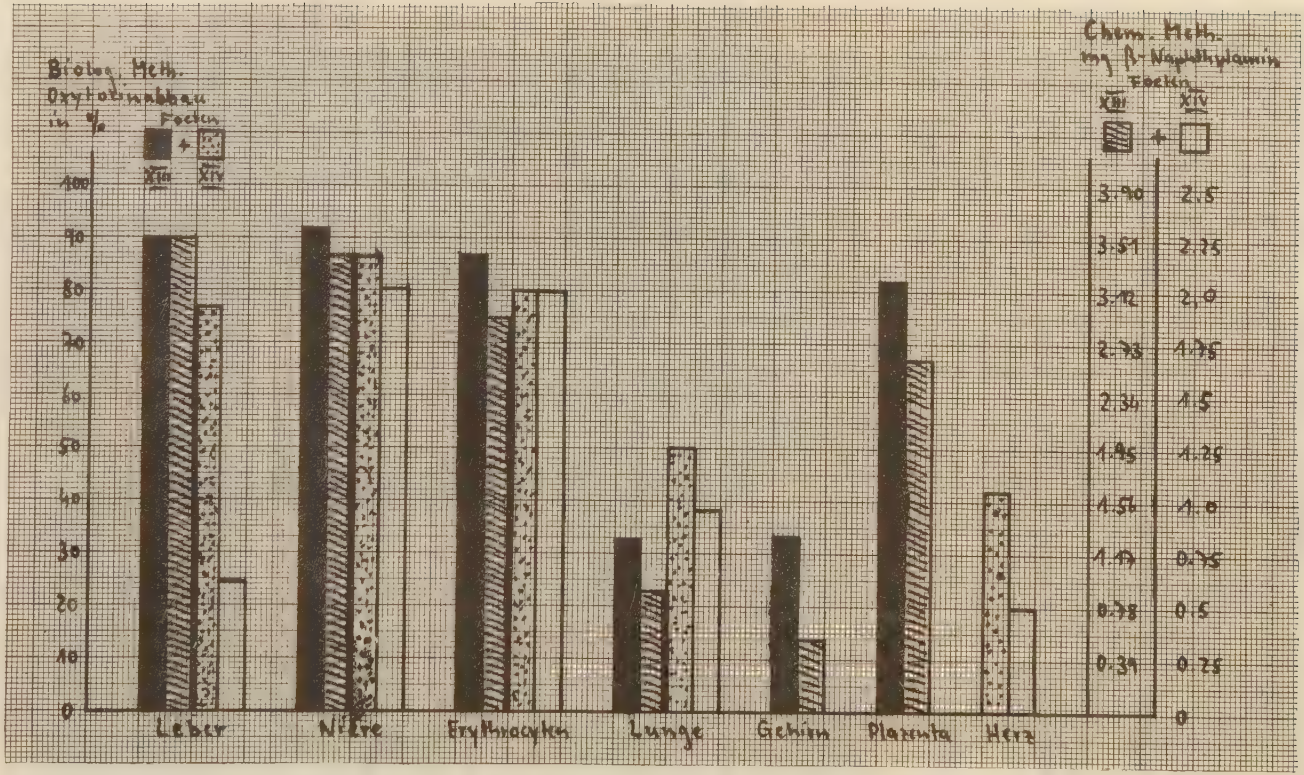


ABBILDUNG 4 (Erkl. im Text) Vergleichende Messungen der foetalen Gewebe-Oxytocinase mit der biologischen und chemischen Methode (s. auch letztes Kapitel).

= Foet XIII, biologisch bestimmt

= Foet XIII, chemisch bestimmt

= Foet XIV, biologisch bestimmt

= Foet XIV, chemisch bestimmt

Die Hemmung der Gehirn-Oxytocinase mit dem Metallkomplexbildner Ae in Abhängigkeit von der Zeit

Gehirnextrakt eines Foeten von 32 cm Länge wurde wie auf S.12 angegeben hergestellt. In 18 kleine Zentrifugengläser wurde jeweils 0,3 ml Extrakt gegeben und dann die Hälfte der Röhrchen mit jeweils 2 mg Ae für 20 min. bei Zimmertemperatur vorinkubiert. Nach Ablauf dieses Zeitraumes, der zu einer eventuellen Inaktivierung des Fermentes voll ausreichend ist, wurden alle Ansätze wieder auf gleiche Weise behandelt und zu jedem Aqua dest., Veronalpuffer und Substratlösung in bekannter Weise zugegeben. Die Inkubationszeit im Wasserbad von 37 C wurde nun variiert. Nach jeweils 5, 10, 15, 25, 40, 60, 120, 180 und 240 min. wurde jeweils ein mit Ae gehemmter und ein ungehemmter Extraktansatz aus dem Inkubationsbad genommen und zur Beendigung der Fermentreaktion sofort mit 1,0 ml Trichloressigsäure versetzt. Zur Ermittlung des Kontrollwertes dienten zwei mit Ae vorbehandelte und zwei nicht vorbehandelte Gläschen gleichen Inhaltes, die ohne Inkubation sofort nach der Substratzugabe mit Trichloressigsäure vermischt wurden. Die weitere Verarbeitung erfolgte bis zur Ablesung der durch die betreffende Menge ß-Naphthylamin hervorgerufenen Farbkonzentration wie bereits beschrieben. Zur Erhöhung der Farbdichte wurden bei diesen Versuchen ausnahmsweise Cuvetten mit 2 cm Schichtdicke verwendet. Der Versuch diente dem Zweck, festzustellen, wie die Hemmung der Gehirn-Oxytocinase durch Ae in Abhängigkeit von der Zeit verläuft - gemessen mit der chemischen Bestimmungsmethode. Hatte es sich doch herausgestellt, dass bei der Messung am isolierten Rattenuterus die Oxytocinase dieses Organes ganz, bei der chemischen Methode aber nur etwa zur Hälfte gehemmt werden konnte. Das Ergebnis (s. Abb.5) zeigt, dass angefangen vom 10 min.-Wert der Prozentsatz der Hemmung zu jedem Zeitpunkt der gleiche ist. Er liegt immer um 50 %. Dies könnte den Schluss zulassen, dass im Gehirn mehrere Aminopeptidasesysteme wirksam sind, die nur zum Teil mit Ae hemmbar und in der Lage sind, Oxytocin zu spalten.

III. VERSUCHE ZUR HEMMUNG VON GEWEBE-OXYTOCINASE MIT VERSCHIEDENEN BEKANNTEN ENZYMINHIBITOREN

Eine kompetitive oder nicht kompetitive Hemmung eines Enzyms ist auf mannigfache Art und Weise möglich. Nach HOFFMANN und OSTENHOFF (12) sind folgende Wege gangbar, um zur Inaktivierung eines Fermentes zu gelangen und damit nähere Aufschlüsse über seine chemische Zugehörigkeit zu erwerben:

a. Eine Hemmung durch Reaktionsprodukte;
b. Hemmung durch Strukturanaloge des Substrates;
c. durch Reaktion mit Sulfhydrylgruppen zur Blockierung der SH-Gruppe (erreich-

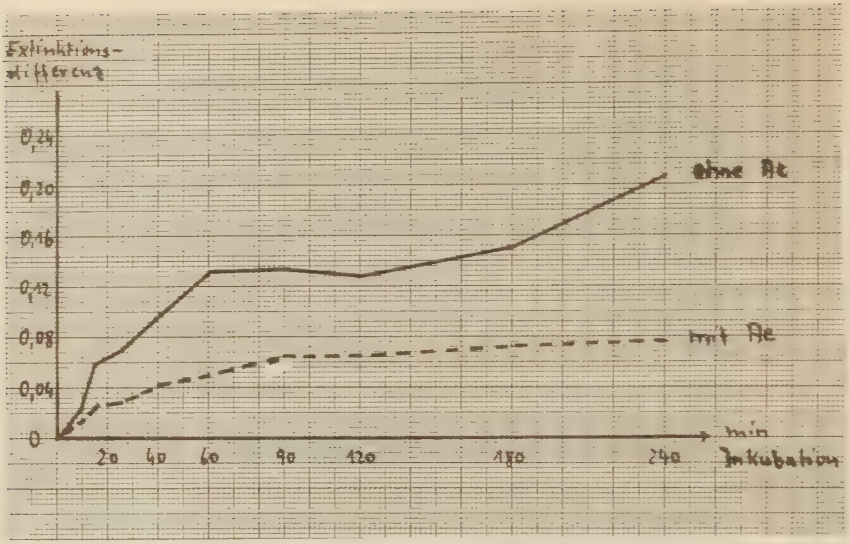


ABBILDUNG 5

Die Aktivität der foetalen Gehirn-Oxytocinase mit zunehmender Inkubationszeit.

bar mit Oxydationsmitteln, mercaptidbildenden Substanzen oder alkylierenden Reagentien);

d. Hemmung durch Bindung des anorganischen Komplements;
e. Hemmung durch Reaktion des Inhibitors mit den Metallbestandteilen der prosthetischen Gruppe;
f. Hemmung durch Reaktion mit dem Co-Enzym;
g. Hemmung durch Reaktion mit dem Substrat.

Wie schon mehrfach erwähnt, ist es WERLE und SEMM (44) gelungen, für die Serumoxytocinase als spezifischen Hemmkörper den Metallkomplexbildner Äthylendiamin-tetraacetat (Ae) zu finden. Dieses Ferment konnte somit ganz allgemein als Metallproteid identifiziert werden. BERANKOWA, RYCHLIK und SORM (1) fanden in ihren Untersuchungen, dass einige peptidische Fragmente des Oxytocins einen kompetitiven Einfluss auf die Serumoxytocinase ausüben. Ebenso entdeckten WINTERSBERGER, TUPPY und STOKLASKA (51) im l-Cystinyl-di-l-tyrosinamid ein kompetitives Substrat der Serumoxytocinase, das deren Wirksamkeit gegenüber Oxytocin wie l-Cystin-di-ß-naphthylamid erheblich herabsetzte. Alle diese Erkenntnisse trugen wesentlich zur Aufklärung der Chemie der Serumoxytocinase bei. In Veröffentlichungen von GREEN, TSOU, BRESSLER und SELIGMAN (9) findet man den Hinweis, dass die im Homogenisat von Rattennieren vorhandene Aminopeptidaseaktivität durch Metallionen völlig gehemmt werden kann. Zur Verwendung

kamen dabei Zn^{++}, Cu^{++}, Co^{++}, Ni^{++}, Cd^{++}, in einer Konzentration von jeweils 0,0005 M. Eine teilweise Hemmung konnte mit Fe^{++}, Mg^{++} und Mn^{++} erzielt werden.

1. Die Einwirkung von verschiedenen chemischen Substanzen auf die Oxytocinaseaktivität in Erythrocyten-Hämolysaten von Erwachsenen

In den nun folgenden Versuchen wurde eine Vielzahl von chemischen Substanzen, die möglicherweise als Enzymhemmer in Frage kommen, in ihrer Wirksamkeit auf eine Gewebe-Oxytocinase untersucht. Zweck dieser Bestimmungen war es, evtl. einen Hemmkörper zu finden, der die Gewebe-Oxytocinase inaktiviert, um so zu einer Aussage über deren chemische Wirksamkeit zu gelangen.

Die Untersuchungen wurden mit Hilfe der chemischen Bestimmungsmethode (TUPPY) durchgeführt. Ausgangsgewebe waren in jedem Fall die Erythrocyten von nichtschwangeren Frauen. Die Herstellung eines stark oxytocinasehaltigen Extraktes aus den roten Blutkörperchen geschah in der auf S.13 angegebenen Weise.
Jeweils 0,3 ml dieses Hämolysats wurden 20 min. lang bei Zimmertemperatur mit 3,0 mg einer der nachstehend aufgeführten Substanzen vorinkubiert. Diese Zeit ist erfahrungsgemäss für eine mögliche Inaktivierung des Fermentes ausreichend. Der weitere Versuchsablauf erfolgte wie auf S.14/15 beschrieben.
Als Vergleichswerte diente die bei jedem Versuch neu ermittelte Oxytocinaseaktivität eines ungehemmten Ansatzes (im folgenden immer als "Leerwert" bezeichnet), für die als Mass die im Spektralkolorimeter abgelesene Extinktionsdifferenz gilt. (Extinktionsdifferenz = Versuchswert minus Kontrollwert). Diese Fermentaktivität des Leerwertes wurde gleich 100 % gesetzt; eine mögliche Abnahme der Oxytocinasewirksamkeit nach Vorinkubation mit Inhibitoren konnte somit prozentual mit der des ungehemmten Ansatzes verglichen werden. Die Multiplikation mit dem Faktor 18,4 unterblieb, weil das Verhältnis der Aktivitäten dadurch nicht geändert wird und die Zahl der ß-Naphthylamin in diesem Falle keine Rolle spielt.

Die folgende Tabelle zeigt nun die hemmende (oder aktivierende) Funktion, die die untersuchten Stoffe auf die Erythrocyten-Oxytocinase ausüben. (Falls nicht anders angegeben, wurden jeweils 3,0 mg der Substanz zur Inaktivierung benützt).

Substanz	Extinktions-differenz	Noch vorhandene O-Aktivit. in %	Hemmung d.Akt. in %	Steigerung d.Akt. in %
1, Leerwert	0,13	100	0	
Cobalt	0,105	80	20	
Ae	0,105	80	20	
Cystin (1,5 mg)	0,094	72	28	
Na-pyrophosphat	0,085	65	35	
Mangan	0,03	26	74	
Nickel	0,013	10	90	
Kupfer	0,00	0	100	
2. Leerwert	0,108	100	0	
8-Oxy-chinolin	0,130	120	-	20
KCN	0,115	106	-	6
Sublimat	0,012	11	89	
Zinkl	0,005	4,5	95,5	
Kupfer (II)	0,005	4,5	95,5	
3. Leerwert	0,158	100	0	
Kaliumjodid	0,26	164	-	64
Natriumnitrit	0,19	120	-	20
H_2O_2	0,135	85	15	
C=O	0,135	85	15	
H_2S	0,115	73	27	
K-ferricyanid	0,105	66	34	
Silbernitrat	0,002	1,3	98,7	
4. Leerwert	0,178	100	0	
Na-fluorid	0,158	89	11	
Alloxan	0,155	87	13	
Jodacetamid	0,093	52	48	
Hydroxylamin	0,035	20	80	
Hydrochinon	0,02	11	89	
Monojodessigsäure	0,018	10	90	
Semicarbacid	0,005	2,8	97,2	
Hydrochinon II	-	4,3	95,7	
Semicarbacid II	-	4,3	95,7	
Hydroxylamin II	-	40	60	
5. Leerwert	0,120	100	0	
$FeSO_4$	0,099	83	17	
Pikrotoxin	0,087	72	28	
Colchizin	-	93	7	
Iproniazid *)		115	-	15

TABELLE 3 (Erkl. im Text)

*) Iproniazid: einer der stärksten Monoaminooxydasehemmer; angewendet als Präparat "Marsilid" der HOFFMANN LA ROCHE A.G.

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass eine ganze Reihe von Stoffen in der Lage ist, in einer Konzentration von 3,0 mg auf 0,3 ml Gewebeextrakt eine gewisse hemmende Wirkung auf die Gewebe-Oxytocinase auszuüben. Jedoch nur Hydrochinon, Semicarbacid, Cu^{++}, Zn^{++} und Ag^{++} sind imstande, die Fermentaktivitäten um über 90 % zu reduzieren. Käme nun eine dieser Substanzen als wirklicher Inhibitor der Erythrocyten-Oxytocinase in Frage, so müsste sie ihre hemmende Wirkung auch in wesentlich geringerer Konzentration (etwa bis 100 γ/ml) ausüben können. Dies war Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Herstellung des Erythrocytenhämolysats, Vorinkubation mit dem Inhibitor und weiterer Versuchsablauf erfolgten wie oben angegeben. Nur wurde mit der Konzentration des Hemmstoffes von ursprünglich 3,0 mg stufenweise auf 25-30 γ pro 0,3 ml Extrakt heruntergegangen. Die Ergebnisse veranschaulicht die folgende Tabelle:

Beispiel: Kupfer:

Konzentration in mg pro 0,3 ml Extrakt	noch erzielte Hemmung in %
3,0	95,5 - 100
1,0	97,5
0,5	58
0,2	6
0,05	10
0,025	4

Die mit Cu^{++} beobachtete "Hemmung" der Gewebe-Oxytocinase lässt sich somit nur bis zu einer Konzentration von 1,0 mg pro 0,3 ml (entspricht 3,3 mg/ml) verfolgen. Es dürfte sich damit bei dieser Reaktion nicht um eine Inhibition, sondern um eine reine Fällung handeln. Die gleichen Ergebnisse erbrachten auch die anderen noch weiter untersuchten Substanzen: Bei Semicarbacid zeigten schon Mengen von 500 γ und 1 mg jeweils keine Hemmung mehr; Zn^{++} bei 500 γ nur mehr 22 %; Hydrochinon bei 300 γ nur noch 30 %. Lediglich Ag^{++} verminderte auch in einer Konzentration von 30 γ/0,3 ml (gleich 100 γ/ml) die Oxytocinaseaktivität noch um 45 %. Um einen spezifischen Hemmkörper dürfte es sich jedoch auch in diesem Falle nicht handeln. Demgegenüber liessen sich einige Substanzen finden, die bei Vorinkubation mit Erythrocytenhämolysat in ebenfalls einer Konzentration von 3,0 mg/0,3 ml eine zum Teil deutliche Steigerung der Oxytocinaseaktivität zur Folge hatten. (KCN, 8-Oxychinolin, Natriumnitrit, Iproniazid und besonders Kaliumjodid). In einem weitergehenden Versuch mit dem Präparat Marsilid (Iproniazid) konnte auch eine Aktivitätssteigerung der Serumoxytocinase um ca 30 % nachgewiesen werden.

2. Die Einwirkung der gleichen Substanzen auf die Oxytocinaseaktivität in foetalen Gewebeextrakten

Die am Beispiel der Erythrocyten-Oxytocinase ermittelte teilweise Hemmung oder Steigerung der Fermentaktivität gab Anlass zu weiteren Versuchen mit foetalen Geweben. Es sollte festgestellt werden, ob sich die in den verschiedenen foetalen Organen nachgewiesenen Gewebe-Oxytocinasen durch die beschriebenen chemischen Substanzen in etwa gleicher Weise beeinflussen lassen. Zur Untersuchung gelangten Extrakte von foetaler Niere, Leber, Lunge und von foetalem Gehirn, die in bekannter Weise hergestellt wurden. Die Vorinkubation von 0,3 ml Gewebeextrakt mit 3,0 mg Hemmstoff erfolgte wie oben angegeben, ebenso der weitere Versuchsablauf. Nur die sieben aktivsten Substanzen wurden in ihrer Wirksamkeit auf die foetale Organoxytocinase bestimmt. Die Ergebnisse werden in der Tab.4 dargestellt, verglichen jeweils mit den bei der Erythrocyten-Oxytocinase bei Erwachsenen gefundenen Werten. Die Zahlen bedeuten dabei die noch vorhandene Oxytocinaseaktivität in %, bezogen auf die des ungehemmten Vergleichsansatzes, dessen Wert wiederum mit 100 % festgesetzt wurde. (s. Tab.4 auf gleicher Seite).
Es zeigen sich dabei folgende Ergebnisse:
Die Werte der gehemmten Ansätze von verschiedenen foetalen Gewebeextrakten verhalten sich untereinander ziemlich ähnlich (ausgenommen bei Semicarbacid), weisen jedoch einige Unterschiede gegenüber der Aktivität der Erythrocyten-Oxytocinase bei Erwachsenen auf. So erweist sich das Nickel als weit nicht so starker Hemmstoff von foetaler Gewebe-Oxytocinase; und vor allem zeigt das Hydroxylamin einen ausgesprochen wirksamkeitssteigernden Effekt, wogegen es bei dem Erythrocytenferment eine deutliche Hemmung von 60-80 % hervorruft. Die übrigen Ergebnisse lassen keine wesentlichen Unterschiede erkennen.

	Erw. Erys	Gewebeextrakt aus foetaler Niere	Leber	Lunge	Gehim
Nickel	10	29	42	41	33
Kupfer (1,0 mg)	2,5	9,5	3,8	0	5
Hydrochinon	4 - 10	2	0	3	5
Jodessigsäure	10	12	18	10	13
Semicarbacid	2,8 - 4	43	43	5,8	8,3
Hydroxylamin	20 - 40	244	145	209	167
Kaliumjodid	164	121	96	118	107

TABELLE 4 (Erkl. im Text)

Abschliessend kann bemerkt werden, dass zwar eine Vielzahl von Stoffen auf die Oxytocinaseaktivität in Geweben einen hemmenden oder wirksamkeitssteigernden

Einfluss ausübt, dass es aber nicht gelungen ist, einen spezifischen Hemmkörper für das oxytocinabbauende Prinzip in Organen zu finden. Einzelne Unterschiede ergeben sich zwischen der Erythrocyten-Oxytocinase des Erwachsenen und foetalen Gewebeenzymen.

IV. DIE THERMOLABILITÄT DER GEWEBE-OXYTOCINASE-AKTIVITÄT

Es sei noch über einen Versuch berichtet, der die Ermittlung der Aktivität von Gewebe-Oxytocinase in Abhängigkeit von der Temperatur zum Ziele hatte.

Erythrocyten-Hämolysate von nichtschwangeren Frauen wurden auf bekannte Weise hergestellt und jeweils 0,3 ml davon in 8 verschiedene Röhrchen gegeben. Mit Ausnahme des ersten Glases, das als Vergleichswert zur Ermittlung der vorhandenen Fermentkonzentration diente, erfolgte nun vor der Zugabe der üblichen Reagentien und darauffolgenden 4-stündigen Inkubation eine verschieden lange Er-

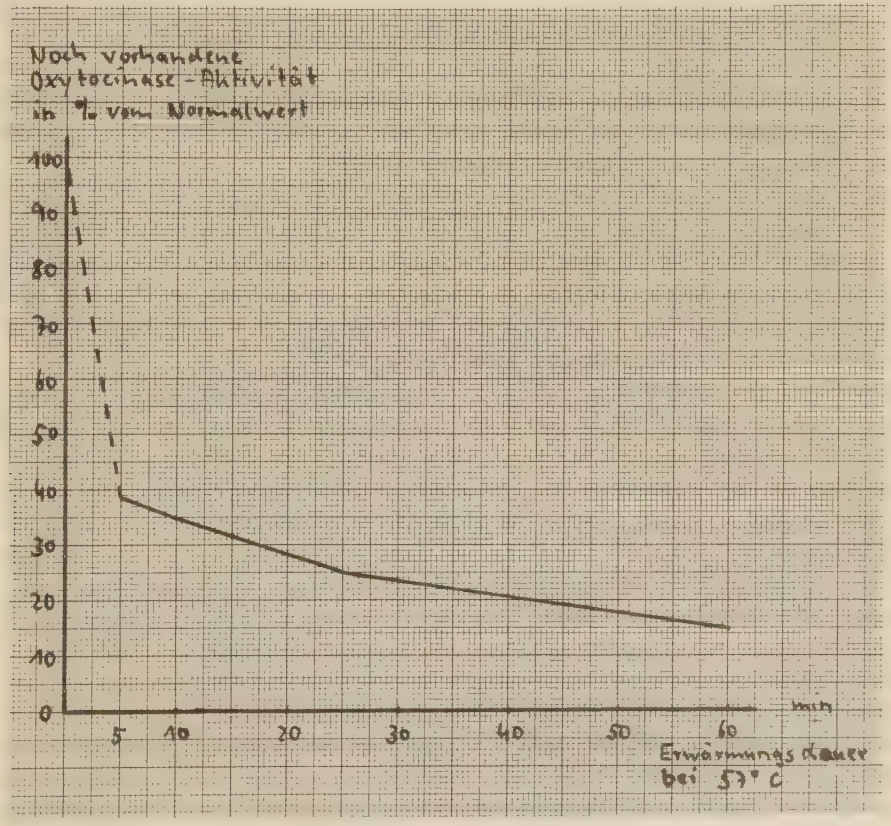


ABBILDUNG 6 (Erkl. im Text)

wärmung des Extraktes im Wasserbad auf 57°C. Die Inkubation der einzelnen Röhrchen betrug 5, 10, 15, 25, 40 und 60 min. Es solltebei diesem Versuch festgestellt werden, ob mit zunehmender Inkubationsdauer bei 57°C eine abnehmende Aktivität der Gewebe-Oxytocinase verbunden ist. Das Ergebnis der Untersuchungen ist in Abb. 6 (s.S.35) dargestellt. Die ermittelte Oxytocinaseaktivität des ersten, nicht bei 57°C erhitzten Röhrchens wurde wieder mit 100 % angegeben.

Es zeigt sich also mit zunehmender Erhitzungsdauer bei 57°C eine deutlich abnehmende Fermentaktivität, die nach einstündigem Erhitzen nur mehr 15 % der normalen Konzentration beträgt. Dies kann als Ausdruck der Thermolabilität der Gewebe-Oxytocinase aufgefasst werden. Der Extrakt im letzten Gläschen wurde wenige Sekunden bei 100°C gekocht und dann weiter in bekannter Weise ausgewertet. Es war in ihm keinerlei Enzymaktivität mehr nachzuweisen. Durch kurzfristiges Kochen wird die Erythrocyten-Oxytocinase also erwartungsgemäss völlig zerstört.

V. DIE OXYTOCINASEAKTIVITÄT BEI BLASENMOLE

In Ergänzung zu den von SEMM (23, 29) durchgeführten Untersuchungen über die Oxytocinaseaktivität im pathologischen Blasenmolengewebe konnte ein weiterer Versuch zu diesem Problem durchgeführt werden.
Durch den Nachweis einer hohen Konzentration sowohl von Serum- als auch Gewebe-Oxytocinase im Extrakt von 5 verschiedenen Hydatidenmolen hatte SEMM herausgefunden, dass der Ursprung der schwangerschaftsspezifischen Serumoxytocinase mit grosser Wahrscheinlichkeit im syncytialen Trophoblasen der Plazenta zu suchen ist. Dieser Nachweis war auch Ziel des folgenden Versuches: Bereitung eines oxytocinabbauenden Extraktes aus Blasenmolengewebe:
Sofort nach der Ausräumung wurde das Molengewebe von anhaftenden Blutresten gereinigt und zwischen Tüchern getrocknet. Durch Scherenschlag eröffnete man die einzelnen Bläschen und gab den Inhalt zusammen mit den eröffneten Bläschen in ein eisgekühltes Zentrifugenglas. Nun wurde zweimal abzentrifugiert, bis der Überstand klar und serumfarben war. Die überstehende Flüssigkeit wurde nunmehr als "Bläscheninhalt" bezeichnet und vom Bodensatz abgetrennt, der die morphologisch festen Bestandteile der Bläschenwände enthielt. Letzterer wurde mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, zwischen Tüchern oberflächlich getrocknet; 5 g hiervon wurden im eisgekühlten Mörser mit Seesand zerrieben, in 5 ml Aqua dest. suspendiert und scharf abzentrifugiert. Die jetzt überstehende, leicht trübe, weissliche Flüssigkeit enthielt die Oxytocinase-Aktivität.
Die Bestimmung der Fermentaktivität erfolgte am isolierten Rattenuterus.
Ansätze:

1. 2,9 ml Blutserum der Patientin + 0,3 IE Oxytocin in 0,1 ml wurden für 150 min. bei 37°C inkubiert. Die Auswertung ergab keinen Oxytocinabbau.

2. 2,9 ml "Bläscheninhalt" + 0,3 IE Oxytocin in 0,1 ml 150 min. bei 37°C inkubiert. Der Oxytocinabbau betrug 0,28 IE = 93 %.
3. 2,9 ml "Bläscheninhalt" wurden 20 min. lang mit 10 mg Ae vorinkubiert, dann Zugabe von 0,2 IE Oxytocin in 0,1 ml und Inkubation von 150 min. Die Auswertung ergab einen Oxytocinabbau von etwas über 90 %.
4. 2,95 ml Gewebeextrakt + 0,15 IE Oxytocin in 0,05 ml (halbe Menge, da Gewebeextrakt 1:1 mit Aqua dest. verdünnt) wurden 150 min. bei 37°C inkubiert. Oxytocinabbau 0,14 IE = über 90 %.
5. 2,95 ml Gewebeextrakt wurden bei Zimmertemperatur mit 10 mg Ae vorinkubiert, dann Zugabe von 0,15 IE Oxytocin in 0,05 ml und Inkubation für 150 min. Wiederum ergab sich bei der Auswertung praktisch keine Hemmung mit Ae.

Es scheint zunächst eine grosse Diskrepanz gegenüber den von SEMM beschriebenen Ergebnissen vorzuliegen. Hatte er doch die Oxytocinaseaktivität im Bläscheninhalt als voll mit Ae hemmbar und als mit der Serumoxytocinase identisch bezeichnen können. Der Fehler konnte rasch in einer im vorliegenden Versuch nicht ganz exakten Aufbereitungsmethode gefunden werden: Durch das Zentrifugieren des abtropfenden Bläscheninhalts zusammen mit den eröffneten Bläschen war ein Teil der Gewebe-Oxytocinase-Aktivität der Molenwände in die überstehende Flüssigkeit (die somit fälschlich als "Bläscheninhalt" bezeichnet worden war) übergegangen.

Um nun die Gewebe-Oxytocinase, die im Bläscheninhalt noch vorhanden war, möglichst zu zerstören, wurde der Bläscheninhalt nunmehr 48 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt und dann erneut ein Kontrollversuch durchgeführt.
Ansätze:

1. 0,65 ml von nochmals frisch gewonnenem Blutserum der Patientin + 1,25 ml Aqua dest. + 1 IE Oxytocin in 0,1 ml wurden 150 min. bei 37°C inkubiert. Die Auswertung ergab erneut, dass kein Oxytocin abgebaut wurde.
2. 0,65 ml Bläscheninhalt (48 Std. bei Zimmertemperatur aufbewahrt) + 1,25 ml Aqua dest. + 1 IE Oxytocin in 0,1 ml für 150 min. bei 37°C inkubiert. Bei der Auswertung ergab sich ein Oxytocinabbau von 0,8 IE = 80 %.
3. 0,65 ml Bläscheninhalt (s.o.) + 5 mg Ae in 0,5 ml Aqua dest. gelöst wurden 20 min. lang bei Zimmertemperatur vorinkubiert. Dann Zugabe von nochmals 0,75 ml Aqua dest. und 1 IE Oxytocin in 0,1 ml. Diesmal ergab die Auswertung, dass kein Oxytocin mehr abgebaut wurde, es konnte somit eine vollständige Hemmung mit Ae erzielt werden.

Das Ergebnis dieses Versuches kann als Beweis dafür angesehen werden, dass im "Bläscheninhalt" der Blasenmole noch eine genügende Menge Gewebe-Oxytocin mit enthalten war, die eine Hemmung mit Ae überdeckte. Nach 48-stündigem Stehenlassen war diese Gewebe-Oxytocinase nun grösstenteils zerstört worden, sodass bei Ansatz 2 und 3 im Kontrollversuch nur noch die Serumoxytocinase wirksam war, die mit Ae voll gehemmt werden konnte.

Durch den enormen Unterschied der im Blutserum und der im Bläscheninhalt bzw. im Gewebeextrakt der Blasenmole vorhandenen Menge des Fermentes Oxytocinase kann neuerdings die Tatsache erhärtet werden, dass dieses Ferment rein plazentaren Ursprungs ist.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. An Hand der Literatur werden zunächst die wichtigsten Erkenntnisse kurz zusammengefasst, die bisher über das schwangerschaftsspezifische Ferment Oxytocinase gewonnen wurden. Auf Wesen, chemische Eigenschaften und Wirksamkeit, Bestimmungsmethoden, Ursprungsstätte und praktische Bedeutung des Enzyms wird dabei näher eingegangen. Besondere Berücksichtigung finden daran anschliessend die noch wenig untersuchten Gewebe-Oxytocinasen.

2. Mit einem Teilgebiet zur Frage der Gewebe-Oxytocinasen beschäftigen sich die vorliegenden Untersuchungen: der oxytocinabbauenden Fähigkeit in Organextrakten von frischen menschlichen Foeten. Zur Bestimmung am isolierten Rattenuterus gelangen dabei 12 Früchte, in deren verschiedenen Organen unterschiedliche Fermentkonzentrationen nachgewiesen werden können. Die Oxytocinaseaktivität erweist sich am höchsten in Erythrocyten, Niere, Leber und der Plazenta, wird geringer in Milz, Herzmuskel, Lunge und Haut und erreicht ihren niedrigsten Wert im Gehirn. Im Nabelschnurextrakt fehlt das Enzym ganz.

3. Zum Unterschied von der schwangerschaftsspezifischen Serumoxytocinase lassen sich die einzelnen foetalen Organoxytocinasen mit Metallkomplexbildnern in ihrer Wirksamkeit nicht oder nur wenig beeinflussen. Chemisch muss ihnen somit ein andersartiger Aufbau zugrundeliegen. Eine Ausnahme bildet einzig die im foetalen Gehirn aufgefundene Oxytocinase, die sich durch Ae fast vollständig inaktivieren lässt.

4. Vergleichende Untersuchungen an foetalen Gewebeextrakten werden mit der biologischen Methode am isolierten Rattenuterus und dem chemischen Aminopeptidasennachweis durchgeführt. Die chemische Bestimmung erbringt dabei im Verhältnis etwa die gleichen Fermentkonzentrationen in den einzelnen Geweben. Bei dieser Durchführung kann die foetale Gehirn-Oxytocinase mit dem Metallkomplexbildner Ae jedoch nur zur Hälfte in ihrer Aktivität gemindert werden, was den Schluss erlaubt, dass in diesem Organ mindestens zwei verschiedene Fermentsysteme wirksam sind.

5. Es wird versucht, für die Gewebe-Oxytocinase, dargestellt am Beispiel der Erythrocyten-Oxytocinase, einen spezifischen Hemmkörper zu finden. Es stellt sich heraus, dass von den untersuchten möglichen Enzyminhibitoren 23 einen zum Teil erheblichen hemmenden bzw. aktivierenden Effekt auf die Wirksamkeit des oxytocinabbauenden Prinzips haben. Eine für die Gewebe-Oxytocinase

spezifische Hemmung kann jedoch in keinem Fall erreicht werden.

6. Diejenigen Inhibitoren oder Aktivatoren, die auf die Erythrocyten-Oxytocinase den stärksten Effekt haben, werden auch in ihrer Wirksamkeit auf die foetalen Gewebeextrakte von Leber, Niere, Lunge und Gehirn erforscht. Es zeigen sich dabei im wesentlichen die gleichen Ergebnisse, was eine ähnliche Struktur dieser Enzyme vermuten lässt. Eine Ausnahme bildet allerdings das Hydroxylamin, das einen aktivitätssteigernden Einfluss auf die Oxytocinase in den foetalen Geweben, einen mässig hemmenden jedoch auf die Erythrocytenaktivität von Erwachsenen ausübt.

7. Die Gewebe-Oxytocinase in Erythrocyten erweist sich als thermolabiles Ferment, da sie bei einer Temperatur von $57^{o}C$ bei zunehmender Einwirkungsdauer rasch an Wirksamkeit verliert. Bei Zimmertemperatur jedoch behalten einige Gewebe-Oxytocinasen lange Zeit ihre stark oxytocinabbauende Fähigkeit.

8. Durch Fermentuntersuchungen in einem Fall von Blasenmole kann neuerdings die Ansicht bekräftigt werden, dass die Bildungsstätte der Serumoxytocinase in der Plazenta zu suchen ist.

9. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen es als wahrscheinlich ansehen, dass im Organismus mehrere Oxytocin-abbauende Prinzipe vorkommen.

Meinen sehr verehrten Herren Lehrern bin ich zu grossem Dank verpflichtet. Besonders danken möchte ich Herrn Priv.Doz.Dr.K.SEMM, Oberarzt an der II.Frauenklinik der Universität München, für die Überlassung des Themas zu dieser Arbeit und dafür, dass er mich bei ihrer Ausführung jederzeit hilfreich, mit Rat und Tat unterstützte. Mein weiterer Dank gilt dem Direktor der II.Frauenklinik der Universität München, Herrn Prof.Dr.R.FIKENTSCHER für die Überlassung eines Arbeitsplatzes sowie die Förderung an seiner Klinik.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. BERANKOWA, Z., J.RYCHLIK und F.SORM: "Inhibition of Oxytocin Inactivation by some Peptides", Experientia 15, 298 (1959).

2. CARBALLO, M.A. und C.J.MENDEZ-BAUER: "Origen placentario de la Oxytocinasa", Seg.Congr.Urug.de Ginetolog. 2, 308 (1957).

3. CHRISTLIEB, M.: "Über den Abbau von Oxytocin und Vasopressin in vitro", Arch.exp.Path.u.Pharm. 194, 44 (1939).

4. DICKER, S.E. und G.A.WHYLEY: "Inactivation of Oxytocin by Plasma of Pregnant Women", J.Obstetr.Gynaec.Brit.Emp. 66, 605 (1959).

5. FEKETE, K.: "Beiträge zur Physiologie der Gravidität", Endokrinologie 7, 364 (1930).

6. FEKETE, K.: "Gibt es während der Schwangerschaft ein aktives Hypophysenhinterlappenhormon im Blut?" Endokrinologie 10, 16 (1932).

7. FRIED, R. und L.WÜST: "Über ein oxytocinabbauendes Ferment aus Schweineovarien", Naturwiss. 41, 238 (1954).

8. EDLBACHER, S. und F.LEUTHARDT: Lehrbuch der physiologischen Chemie, Berlin 1954.

9. GREEN, M.N., K.C.TSOU, R.BRESSLER und A.M.SELIGMAN: "The colorimetrich Determination of Leucine Aminopeptidase Activity with l-Leucyl-ß-Naphthylamide Hydrochloride", Arch.Biochem. and Biophys. 57, 458 (1955).

10. GULLAND, J.M. und T.F.MACRAE: "The Oxytocic Hormone of the Posterior Lobe of the Pituitary Gland - The Action of Preparation of Animal proteolytic Enzymes and some Observations on the Nature of this Hormone", Biochem.J. 27, 1383 (1933).

11. GULLAND, J.M. und T.F.MACRAE: "Oxytocic Hormone and Yeast Proteolytic Enzymes", Biochem.J. 27, 1237 (1933).

12. HOFFMANN, O. und OSTENHOFF: "Enzymologie", Wien 1954.

13. JONES, A.M. und W.SCHLAPP: "Action and Fate of Pituitary Extracts", J. Physiol. 87, 144 (1936).

14. LARSON, E.: "The Effect of Tissue Enzymes on Posterior Pituitary Gland", J.Pharm.Amer. 57, 132 (1936).

15. LARSON, E.: "Tolerance and Fate of the Pressor Principle of Posterior Pituitary Extract in anaesthetized Animals", J.Pharm.Amer. 62, 347 (1938).

16. MENDEZ-BAUER, C.J. und M.A.CARBALLO: "Metodo para la determinacion cuantitativa de la Oxytocinasa", Seg.Congr.Urug. de Ginetolog. 2, pag.291 (1957).

17. MÜLLER-HARTBURG, W., H.NESVADBA und H.TUPPY: "Die Anwendung einer chemischen Methode zur Bestimmung des Oxytocinasespiegels im Schwangerenserum", Arch.Gynäk. 191, 442 (1959).

18. PAGE, E.W.: "The Value of Plasma Pitocinase Determination in Obstetrics", Am.J.Obstetr.Gynaec. 52, 1014 (1946).

19. PAGE, E.W.: "A Blood Test for estimating the Week of Pregnancy", Science 105, 292 (1947).

20. RIMBACH, E.: "Enzymologie der Geburtshilfe", Gustav Fischer Verlag, Jena 1960.

21. SEMM, K.: "Die klinische Bedeutung der Oxytocinasebestimmung", Klin. Wschr. 1955, 817.

22. SEMM, K.: "Der Abbau von synthetischem Oxytocin", Naturwiss. 44, 424 (1957).

23. SEMM, K.: "Die Bildungsstätte der Serumoxytocinase", Arch.Gynäk. 191, 57 (1958).

24. SEMM, K.: "Zum Problem der Wehen", Mchn.Med.Wschr. 1959, 1090.

25. SEMM, K.: "Über die geburtshilfliche Bedeutung von Wehenmitteln", Mchn. Med.Wschr. 1959, 1167.

26. SEMM, K.: "Die geburtshilfliche Bedeutung der Serumoxytocinase", Bibl. Gynaec. Vol 20, pp 171, Basel-New York 1959.

27. SEMM, K.: "Über Oxytocin-abbauende Fermente", Vortr.21. Int.Congr. of Physiol., Buenos Aires, Aug.1959.

28. SEMM, K.: "Die Standardisierung von Hypophysenhinterlappen-Extrakten am isolierten Rattenuterus", Arch.exp.Path. u. Pharmak. 220, 447 (1953).

29. SEMM, K.: "Das Wehenproblem mit besonderer Berücksichtigung des Oxytocin - Oxytocinasehaushaltes", Stuttgart 1960, Enke Verl. (Beil. Zschr. f.Geburtsh. 154).

30. SEMM, K. und E.WAIDL: "Histochemischer Nachweis plazentarer Enzyme", z.Zt. im Druck.

31. SMITH, E.L. in J.B.SUMNES und K.MYRBÄCK: "The Enzymes", Bd.1, Teil 2, S.739, New York 1951.

32. STOKLASKA, E. und E.WINTERSBERGER: "Zum Mechanismus des Oxytocin- und Vasopressinabbaues durch Schwangerenserum", Arch.exp.Path. u. Pharmak. 236, 358 (1959).

33. TITUS, M.A., R.REYNOLDS, M.B.GLENDENING und E.W.PAGE: "Plasma Aminopeptidase Activity (Oxytocinase) in Pregnancy and Labor", Amer. J.Obstetr.Gynaec. 80, 1124 (1960).

34. TUPPY, H.: "The Amino-Acid Sequence in Oxytocin", Biochem. et Biophys. Acta 11, 449 (1953).

35. TUPPY, H. und H.MICHL: "Über die chemische Struktur des Oxytocins", Mh. f.Chem. 84, 1011 (1953).

36. TUPPY, H. und H.NESVADBA: "Über die Aminopeptidaseaktivität des Schwangerenserums und ihre Beziehung zu dessen Vermögen, Oxytocin zu inaktivieren", Mh.f.Chem. 88, 977 (1957).

37. TUPPY, H. und E.WINTERSBERGER: "Reinigung und Eigenschaften der Serumoxytocinase", Mh.f.Chem. 91, 1001 (1960).

38. WAIDL, E. und K.SEMM: "Der Beginn der hypothalamischen Neurosekretion in der Fetalzeit", Arch.Gynäk. 192, 269 (1960).

39. WERLE, E. und G.EFFKEMANN: "Über die oxytocinabbauende Fähigkeit des Schwangerenblutes", Arch.Gynäk. 171, 286 (1941).

40. WERLE, E. und G.EFFKEMANN: "Über die histaminzerstörende Fähigkeit des Schwangerenblutes", Arch.Gynäk. 170, 82 (1940).

41. WERLE, E., K.SEMM und R.ENZENBACH: "Über die Oxytocinase des Schwangerenblutes und der Erythrocyten". Arch.Gynäk. 177, 211 (1950).

42. WERLE, E. und G.EFFKEMANN: "Schnellmethode zur Schwangerschaftsbestimmung", Klin.Wschr. 1940, 717.

43. WERLE, E. und K.SEMM: "Aktivitätsbestimmung der Serumoxytocinase als Schwangerschaftsnachweis", Klin.Wschr. 1951, 544.

44. WERLE, E. und K.SEMM: "Über die Oxytocinase des Schwangerenblutes", Arch.Gynäk. 187, 449 (1956).

45. WERLE, E. und A.KALVELAGE: "Über die vasopressininaktivierende Kraft des Blutes von Schwangeren und die Natur des inaktivierenden Prinzipes", Biochem.Z. 308, 405 (1941).

46. WERLE, E., A.HEVELKE und K.BUTHMANN: "Zur Kenntnis des Oxytocinabbauenden Prinzipes des Blutes", Biochem.Z. 309, 270 (1941).

47. WERLE, E. und L.MAIER: "Über den Abbau von Oxytocin und Vasopressin durch Milchdrüsenextrakte der Kuh", Naturwiss. 41, 380 (1954).

48. WERLE, E. und G.EFFKEMANN: "Zur Kenntnis des Histaminstoffwechsels während der Schwangerschaft", Arch.Gynäk. 172, 448 (1941).

49. WERLE, E. und K.SEMM: "Methode zur Schwangerschaftsdiagnose mit Bestimmung des Alters der Frucht", Arch.Gynäk. 187, 106 (1955).

50. WINTERSBERGER, E. und H.TUPPY: "Zonen-Elektrophorese von Aminopeptidasen in Stärkegel", Mh.f.Chem. 91, 406 (1960).

51. WINTERSBERGER, E. H.TUPPY und E.STOKLASKA: "Über ein kompetitives Substrat der Oxytocinase", Mh.f.Chem. 91, 577 (1960).

LEBENSLAUF

Am 3.12.1935 wurde ich in Hof geboren als Sohn des Direktors des städtischen Krankenhauses in Selb (Ofr.), Dr.Josef Wiendl und seiner Ehefrau Marie, geb. Echterhoff. Nach dreijährigem Besuch der Volksschule trat ich 1945 in die Oberrealschule in Selb ein, an der ich im Jahre 1953 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1953/54 begann ich an der Universität München mein Medizinstudium, studierte weiter in Hamburg und wieder in München und legte nach 11 Semestern im Juni 1959 mein Medizinisches Staatsexamen vor dem Prüfungsausschuss der Universität München mit dem Prädikat "sehr gut" ab. Vom 1.9.59 bis zum 31.5.60 war ich als Medizinalassistent an der II.Frauenklinik der Universität München tätig, woselbst ich die vorliegende Arbeit anfertigte. Meine weitere Medizinalassistentenzeit verbrachte ich vom 1.6.60 bis 31.12.60 am Pathologischen Institut der Universität München; seit dem 1.1.61 bin ich in der II. Medizinischen Universitätsklinik in München beschäftigt.